

VŠB – Technická univerzita Ostrava  
Fakulta elektrotechniky a informatiky  
Katedra kybernetiky a biomedicínského  
inženýrství

Měření a objektivizace bioelektrických  
potenciálů rostlin  
Measurement and Objectification of  
Bioelectrical Potentials of Plants

## Zadání diplomové práce

Student: **Mgr. Barbora Hrvolová**  
Studijní program: N2649 Elektrotechnika  
Studijní obor: 3901T009 Biomedicínské inženýrství  
Téma: **Měření a objektivizace bioelektrických potenciálů rostlin**  
**Measurement and Objectification of Bioelectrical Potentials of Plants**

### Zásady pro vypracování:

1. Seznámení se s problematikou vzniku a šíření biopotenciálů rostlin.
2. Seznámení se s problematikou měření biopotenciálů rostlin a projevů na vnější stimul.
3. Návrh a realizace měřicího řetězce pro měření el. aktivity rostlin.
4. Zpracování a vyhodnocení výsledků měření.

### Seznam doporučené odborné literatury:

1. CHMELAŘ, M. - DRASTICH, A. - ROZMAN, J. *Lékařská přístrojová technika* 2. 1. vyd. Praha : Nakladatelství techn. lit., 1984. 179 s.
2. CHMELAŘ, M. *Lékařská přístrojová technika I*. Brno: CERM, 1995. 192 s. ISBN 80-8586-763-X.
3. BRONZINO, J. D. et al. *The biomedical engineering handbook*. Boca Raton(USA): CRC Press, 1995. 2896 s. ISBN 0849383463/978-0849383465.
4. SVATOŠ, J. *Biologické signály I*. Praha: ČVUT Praha, 1998. 202 s. ISBN 8001018229.
5. PENHAKER, M. - IMRAMOVSKÝ, M. - TIEFENBACH, P. *Lékařské diagnostické přístroje: učební texty*. 1. vyd. Ostrava: VŠB-TU Ostrava, 2004. 320 s. ISBN 80-248-0751-3 .
6. CARR, J. - J. - BROWN, J. - M. *Introduction to biomedical equipment technology*. 4th ed. Upper Saddle River(USA): Prentice Hall, 2001. 743 s. ISBN 0-13-010492-2.
7. MAC KAY, R. S. *Bio-Medical Telemetry: Sensing and Transmitting Biological Information from Animals and Man*. 2nd Edition. Wiley-IEEE Press, 1998. ISBN: 978-0-7803-4718-2.
8. FRANDEN, J. *Handbook of Modern Sensors: Physics, Design, and Applications*. 3rd edition. Springer, 2003. 589 s. ISBN-13: 978-0387007502.

Formální náležitosti a rozsah diplomové práce stanoví pokyny pro vypracování zveřejněné na webových stránkách fakulty.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Marek Penhaker, Ph.D.**

Datum zadání: 18.11.2011

Datum odevzdání: 04.05.2012

doc. Ing. Jiří Koziorek, Ph.D.  
vedoucí katedry



prof. RNDr. Václav Snášel, CSc.  
děkan fakulty

## Prohlášení studenta

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně. Uvedla jsem všechny literární prameny a publikace, ze kterých jsem čerpala.

Dne: 4.5.2012



Podpis

# Abstrakt

V teoretické části této práce jsou popsány historické kořeny rostlinné neurobiologie, teorie vzniku a šíření rostlinných potenciálů a způsoby jejich měření. V experimentální části této práce jsme změřili variační potenciály rajčete tyčkového (*Lycopersicon lycopersicum*) odrůdy Tornádo, které vznikaly jako reakce na tepelný podnět, kterému jsme vybrané rostliny vystavily. Jelikož jsme chtěli zjistit, zda rostlina reaguje na tepelný podnět rovněž na úrovni fyziologické, zvolili jsme za objektivizační parametr zastoupení pigmentů. Zastoupení pigmentů jsme zjišťovali analýzou extraktů pigmentů pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie.

# Klíčová slova

*Rostlinná neurobiologie, variační potenciál, akční potenciál, extracelulární měření, HPLC*

# Abstract

Development of the plant neurobiology, generation and propagation of plant potentials and measurement of these signals are described in the theoretical part of this work. In the experimental part we measured slow wave potentials of the tomato (*Lycopersicon lycopersicum*). Slow wave potentials were generated in a response to the thermal stimuli. We want to know if the tomato plant responds to the thermal stimuli on the physiological level. We chose the distribution of plant pigments as a parameter of objectification. The distribution of the plant pigments we determined by the HPLC analysis of prepared extracts.

# Keywords

*Plant neurobiology, slow wave potential, action potential, extracellular measurement, HPLC*

## Seznam použitých zkratk

Zkratka	Význam
AP	Akční potenciál
VP	Variační potenciál
PB	Parenchymatická buňka
P	Průvodní buňka
S	Sítkovice
CHS	Chemická substance
EKG	Elektrokardiografie
EEG	Elektroencefalografie
KCl	Chlorid draselný
AgCl	Chlorid stříbrný
U/I	Napětově proudový převodník
I/U	Proudově napětový převodník
A/D	Analogově digitální převodník
PC	Osobní počítač
REF	Referentní elektroda
HPLC	Vysoce účinná kapalinová chromatografie

# Seznam použitých termínů

Termín	Význam termínu
<b>elektrofyzilogie</b>	Věda zabývající se biochemickými a biofyzikálními ději v organismu
<b>Rostlinná neurobiologie</b>	Věda zabývající se vedením signálu v rostlinách
<b>Xylém</b>	Dřevní část cévního svazku
<b>Floém</b>	Lýková část cévního svazku
<b>plazmodesma</b>	Mikroskopický kanál na buněčné úrovni v rostlinných pletivech
<b>Tensid</b>	Povrchově aktivní látka
<b>Detergent</b>	Chemická látka určená k čištění případně k rozkladu
<b>Pulvinus</b>	Skupina buněk v bázi listu některých rostlin
<b>Symplast</b>	Soubor propojených protoplastů v rostlinném těle

# Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíle práce.....	2
3	Biopotenciály.....	3
3.1	Historie bioelektrických signálů.....	3
3.2	Vývoj rostlinné neurobiologie.....	6
3.3	Vznik a šíření rostlinných potenciálů.....	11
3.3.1	Buněčná membrána.....	11
3.3.2	Klidový membránový potenciál.....	17
3.3.3	Akční potenciál.....	18
3.3.4	Variační potenciál.....	20
3.4	Způsoby přenosu elektrických signálů.....	22
3.5	Fyziologické aspekty evokovaných signálů.....	24
4	Způsoby měření potenciálů.....	26
4.1	Extracelulární měření.....	26
4.2	Intracelulární měření.....	27
5	Měření biopotenciálů a jejich objektivizace.....	28
5.1	Materiál.....	28
5.2	Zařízení pro měření rostlinných potenciálů.....	29
5.2.1	Příprava měření.....	29
5.2.2	Měřicí aparatura.....	32
5.3	Měření evokovaných variačních potenciálů.....	34
5.4	Výsledky měření a zpracování naměřených dat.....	35
5.5	Objektivizace měření evokovaných potenciálů.....	41
5.5.1	Materiál.....	41
5.5.2	HPLC analýza pigmentových extraktů.....	42
5.5.3	Výsledky a zpracování chromatografické analýzy.....	44
6	Závěr.....	48

Seznam obrázků .....	49
Seznam tabulek .....	51
Použitá literatura .....	52



# 1 Úvod

Rostliny jsou neustále exponovány široké škále stále se měnících vlivů okolního prostředí, ke kterým patří například změny teploty, osvětlení, povětrnostních podmínek, gravitace, půdního složení a množství dostupných živin. Jelikož je každá rostlina živým organismem, a aby byla schopná přizpůsobit se či dokonce přežít tyto dynamické změny prostředí, musí disponovat řadou adaptačních a informačních mechanismů. Rostliny generují v reakci na tyto změny řadu intracelulárních a extracelulárních signálů, zahrnujících i signály elektrické. Jelikož tyto signály vznikají jako reakce na určitý podnět, mluvíme o tzv. signálech evokovaných. U rostlin se jedná konkrétně o variační a akční potenciály.

V teoretické části této práce jsou popsány historické kořeny rostlinné neurobiologie, tedy vědy zabývající se genezí a šířením rostlinných signálů, teorie vzniku a šíření rostlinných potenciálů a způsoby jejich měření.

V experimentální části této práce jsme změřili variační potenciály rajčete tyčkového (*Lycopersicon lycopersicum*) odrůdy Tornádo, které vznikaly jako reakce na tepelný podnět, kterému jsme vybrané rostliny vystavily. Jelikož jsme chtěli zjistit, zda rostlina reaguje na tepelný podnět rovněž na úrovni fyziologické, zvolili jsme za objektivizační parametr zastoupení pigmentů. Zastoupení pigmentů jsme zjišťovali pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie.

Měření biopotenciálů rostlin je poměrně složité. I když se první zmínky o snímání rostlinných potenciálů objevují již v 18. století, doposud existuje v této oblasti mnoho neznámých. Tento fakt je zapříčiněn především různou reaktivitou rostlin na různé stimuly. Různé reakce byly zaznamenány i v případě aplikace kvantitativně stejného podnětu na geneticky i věkově homogenní skupinu rostlin, která byla pěstována v definovaných podmínkách. Z těchto důvodů mohou další pokusy o kvalitnější měření a interpretaci těchto potenciálů značným způsobem přispět k lepšímu poznání chování, fyziologie a adaptačních mechanismů rostlin. Poznatky získané tímto měřením mohou tedy do budoucna kladně přispět k určitému ovlivnění úrovně pěstování hospodářsky významných rostlin.

## 2 Cíle práce

Při zadávání tématu této práce bylo stanoveno hned několik cílů:

1. Seznámit se s problematikou vzniku a šíření biopotenciálů rostlin.
2. Seznámit se s problematikou měření biopotenciálů rostlin a projevů na vnější stimul.
3. Naměřit evokované potenciály rostlin.
4. Provézt porovnání naměřených evokovaných signálů s biochemickými parametry, které mají odpovídající výpovědní hodnotu o stavu rostliny.

## 3 Biopotenciály

Existence biologických signálů má původ buď v samotných životních projevech daného organismu, nebo je vyvolána vnějším působením na něj. Bioelektrická aktivita je základem všech životních procesů. Pokud umístíme na lidské tělo nebo na jakýkoli živý organismus elektrody a propojíme je s citlivým voltmetrem, bude možno pozorovat směs trvalých a v čase proměnlivých elektrických potenciálů, jejichž hodnota závisí na umístění elektrod. Tyto potenciály jsou výsledkem komplexních biochemických procesů. Na úrovni molekulární, buněčné, tkáňové i orgánové studuje biochemické děje v organismech vědní obor zvaný elektrofyziologie. Obor, který se konkrétně zabývá biopotenciály rostlin, bývá označován jako rostlinná neurobiologie. Studium těchto potenciálů je možné získat mnoho informací o funkci, zdraví a stavu zkoumaného organismu. K efektivnímu poznání biopotenciálů je nutné porozumět jejich generování a propagaci a optimálně je i měřit. (Towe, 2004)

### 3.1 Historie bioelektrických signálů

Historie poznatků o bioelektrických signálech má své kořeny již v 18. století. Průkopníkem v tomto oboru byl Luigi Galvani a Alessandro Volta (Obr. 3.1, Obr. 3.2).



Obrázek 3.1 Luigi Galvani<sup>1</sup>.



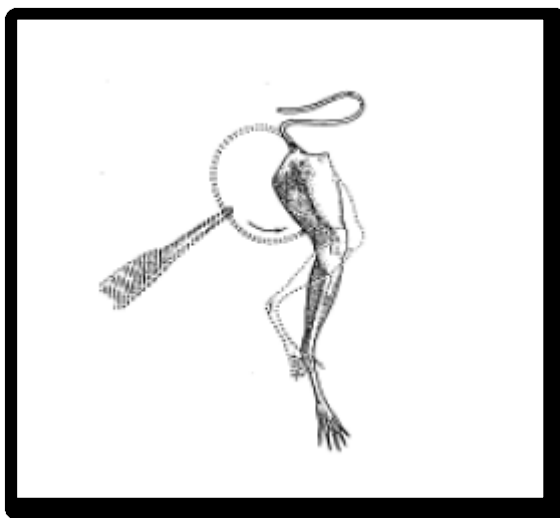
Obrázek 3.2 Alessandro Volta<sup>2</sup>

---

<sup>1</sup> Dostupné z: < [http://en.wikipedia.org/wiki/Luigi\\_Galvani](http://en.wikipedia.org/wiki/Luigi_Galvani) > [citováno 10. prosince 2011]

<sup>2</sup> Dostupné z: < [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Alessandro\\_Volta.jpeg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Alessandro_Volta.jpeg) > [citováno 10. prosince 2011]

Galvani realizoval své pokusy na žábách stehýnkách, preparoval svaly a nervová vlákna, která následně připojoval k různým zdrojům elektřiny (Obr. 3.3). Touto elektrickou stimulací způsobil záškuby preparované končetiny.



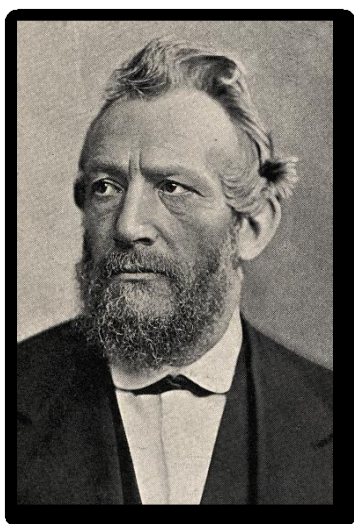
*Obrázek 3.3 Galvaniho experiment demonstrující svalovou kontrakci bez použití odlišných látek (tkáň a kov).*

Tento experiment vedl mezi Galvanim a Voltou k diskuzi, jež se zabývala otázkou „Zda může elektrický stimul aktivovat svalovou aktivitu?“. Galvani tento jev pojmenoval „elektrická aktivita zvířete“. Nyní již víme, že „elektrická aktivita zvířat“ je způsobena tokem určitých iontů skrz buněčnou membránu. Protože záškuby tkáně mohly být pozorovány po aplikaci čistě fyzikálního stimulu, Volta jsi byl jistý, že tento jev mohl být způsoben dotykem dvou různých látek. Jeho myšlenka však byla zavržena díky jednoduchému experimentu. V tomto pokusu Volta vypreparoval z jedné žáby dva nervy, které následně spojil. K jeho zklamání došlo ke svalové kontrakci. Voltovi experimenty s generací elektřiny plynoucí z dotyku různých objektů vedly k vývoji galvanického článku. Práce druhého z našich průkopníků, Galvaniho, zůstala nepovšimnuta až do počátku 19. století. V raném období 19. století byly Galvaniho pokusy velmi často opakovány, ale jejich interpretace byla mylná. Poté co Carlo Matteuci (Obr. 3.4) identifikoval orgán, zodpovědný za elektrickou aktivitu ryb, obrátil svou pozornost na potenciály způsobující svalovou kontrakci. V roce 1838 uveřejnil své první poznatky o této oblasti. Ukázal, že i v klidovém stavu je mezi poškozeným a intaktním povrchem svalové buňky potenciálový rozdíl. Tento potenciál byl dostatečně velký, aby jej bylo možné změřit. Carlo Matteuci jako první demonstroval, že je možné indukovat svalovou kontrakci akčním potenciálem. Rovněž uvedl, že akční potenciál souvisí s depolarizací klidového potenciálu svalu. (Stahlberg, 2006)



*Obrázek 3.4 Carlo Matteucci.<sup>3</sup>*

Nicméně, to byl Emil Heinrich du Bois-Reymond (Obr. 3.5), který pod vedením Alexandra von Humbolta, správně interpretoval experimenty s membránovými potenciály. Vytříbil i metody snímání svalových proudů ze žab a dokonce i lidí. Poslední osobou, jež je potřeba zmínit je Hermann von Helmholtz (Obr. 3.6). Tento vědec určil rychlost šíření elektrického signálu podél nervové buňky. Zjistil, že nervové signály se mohou šířit rychlostí pouze 10-100 metrů za sekundu.(Stahlberg, 2006)



*Obrázek 3.5 Emil Heinrich du Bois-Reymond.*



*Obrázek 3.6 Hermann von Helmholtz.<sup>4</sup>*

Helmholtz nepřispěl do poznání bioelektrických signálů pouze tímto objevem. Vyvinul také řadu nástrojů zpřesňujících měření biopotenciálů.

---

<sup>3</sup> Dostupné z: < [http://en.wikipedia.org/wiki/Carlo\\_Matteucci](http://en.wikipedia.org/wiki/Carlo_Matteucci) > [citováno 11. ledna 2012]

<sup>4</sup> Dostupné z: < [http://en.wikipedia.org/wiki/Hermann\\_von\\_Helmholtz](http://en.wikipedia.org/wiki/Hermann_von_Helmholtz) > [citováno 11. ledna 2012]

## 3.2 Vývoj rostlinné neurobiologie

Po dlouhou dobu byly rostliny považovány za živé organismy, jež mají omezenou schopnost pohybu. Toto omezení bylo vysvětlováno omezenou schopností vnímat. Výjimku představovaly rostliny schopné rychlých pohybů jako *Mimosa pudica* (Obr. 3.7), *Dionea muscipula* (Obr. 3.8) či úpony popínavek.



Obrázek 3.7 *Mimosa pudica*.



Obrázek 3.8 *Dionea muscipula*.

Tyto „citlivky“ přitáhly pozornost mnoha výjimečných výzkumníků jako Pfeffera, Burdon – Sandersona, Darwina, Haberlandta a Bose. Zjistili, že tyto zvláštní rostliny nejsou vybaveny pouze řadou mechanoreceptorů citlivějších než lidské prsty, ale že jejich pohyby jsou indukovány přes akční potenciály. Dalšího pokroku na poli rostlinné neurobiologie bylo dosaženo až po ověření experimentů zmiňovaných v předešlé obecnější kapitole. (Stahlberg, 2006)

V 30. letech 19. století Umrath a Osterhout uskutečnili první spolehlivá vnitrobuněčná měření membránových potenciálů. Měřené potenciály se jim podařilo i zaznamenat. Když bylo ve 40. letech toto měření vylepšeno precizní elektronikou – zesilovačem a napěťovými svorkami, bylo možné sledovat namísto napětí iontový proud, který přímo monitoroval aktivitu iontových kanálů. Důmyslná aplikace těchto metod vedla k detailnímu porozumění různým druhům iontů a mechanismů souvisejících se změnami membránového napětí, hlavně akčního potenciálu. Objeven byl například rozdílný mechanismus vzniku akčního potenciálu u rostlin a zvířat. U zvířat vznikl akční potenciál přílivem iontů  $\text{Na}^+$ , zatímco u geneze rostlinného akčního potenciálu se uplatňoval vtok  $\text{Ca}^{2+}$  a/či odtok  $\text{Cl}^-$  iontů. (Stahlberg, 2006)

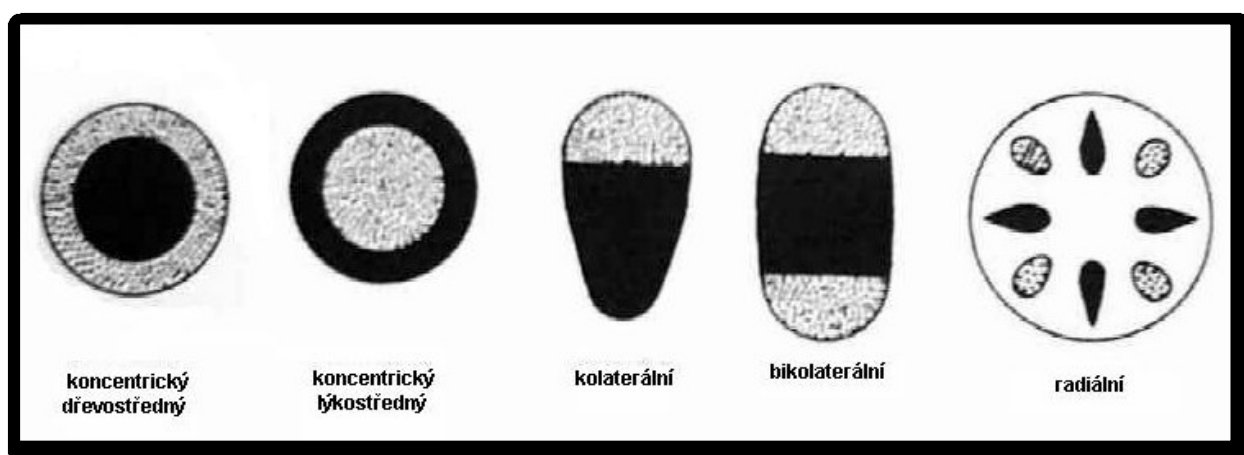
První pokusy o extracelulární záznam rostlinného akčního potenciálu byly iniciovány Charlesem Darwinem. Provedl je však zvířecí fyziolog Burdon – Sanderson v roce 1873 na listech

mucholapky (*Dionea muscipula*). Již nyní se objevuje polemika nad otázkou stejné či podobné role akčního potenciálu rostlin a potenciálu preparovaných zvířecích nervů. Tento názor na věc však nebyl všeobecně uznáván. Skoro za fakt se bere schopnost akčního potenciálu uzavírat past mucholapky (Obr. 3.9). Tato vlastnost ale však nebyla doposud definitivně prokázána.



Obrázek 3.9 Past mucholapky (*Dionea muscipula*) s úlovkem.

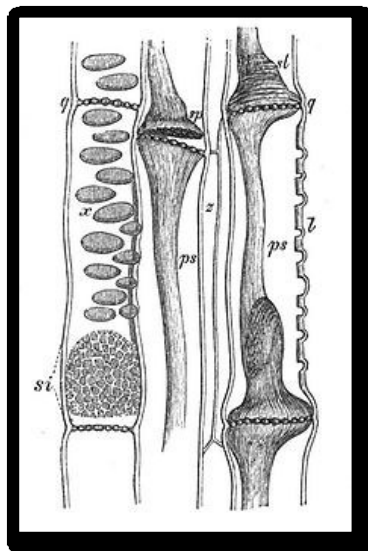
Kunkel a Bose měřili membránové potenciály i na Mimóze, u které pozorovali viditelné pohyby listů. Vědci Dutrochet a Pfeffer usoudili ze svých pokusů, během kterých po excitaci a propagaci přerušovali řezem cévní svazky (Obr. 3.10), že se podněty musí rostlinou pohybovat právě přes ně, a to dřevní částí. Pokud bychom použili moderní terminologii, tak by se jednalo o xylém. Haberlandt přerušoval nedřevěnou, lýkovou část cévních svazků, tedy floém. Floém označil za cestu, kterou se rostlinným organismem šíří podněty. Jeho tvrzení bylo potvrzeno několika studiemi.



Obrázek 3.10 Typy cévních svazků.



Akční potenciály mají největší amplitudu blízko nebo uvnitř floému, v sítkovicích (Obr. 3.11). Další studie uvádějí, že se akční potenciály šíří se stejnou rychlostí a amplitudou skrze všechny buňky cévního svazku. Po těchto objevech se díky izolaci cévních svazků začínají studovat i evokované potenciály. Podnětem byl kupříkladu tepelný stimul. Když se došlo k závěru, že elektrická povaha izolovaných cévních svazků je srovnatelná s elektrickým chováním vypreparovaných žabích nervů, začalo se tedy oficiálně používat termínu rostlinný nerv. Laikové či méně zasvěcení vědci se nemohli smířit s existencí rostlinných nervů i u normálních neboli „méně citlivých“ rostlin. Rostliny se přestaly dělit nesprávně na „citlivé“ a „méně citlivé“. Následně se začalo uvažovat o důležitosti informací, jež tyto signály musí nést. Význam těchto signálů byl nalezen i v propojení s mechanismy respirace, fotosyntézy, opylování, floémového transportu či v řadě obranných mechanismů.



Obrázek 3.11 Sítkovice.

Na konci 19. století S. Ramon y Cajal poskytl odborné veřejnosti detailní pohled na nervové buňky. Demonstroval existenci akčních potenciálů a mechanoreceptorů u *Mucholapky* i *Mimózy* stejně jako u mnoha dalších rostlin. Tyto objevy byly dostatečným stimulem pro hledání struktur, které by mohly usnadnit rychlou propagaci těchto a dalších excitačních signálů. Vědci začali zkoumat snadno barvitelné vedení intracelulární plazmy, které prochází skrze lumen mnoha rostlinných buněk. Někdy prochází i přes několik buněk, a proto byla zvažována i jeho nervová funkce. Po zvážení všech možných přístupů Haberlandt dospěl k závěru, že jedinými strukturami, jež v rostlinách mohou fungovat obdobně jako lidské nervy, jsou protáhlé floémové buňky cévních svazků. Ty však nelze označovat za nervy. Od tohoto zjištění se v článcích, přednáškách i učebnicích jednoznačně uvádí, že rostliny nervy nemají. Navzdory tomu Darwin, Pfeffer a Bose formulují tvrzení, o společné funkci cévních svazků a sítě nervových buněk. Společnou funkcí má být schopnost vést analogový, tedy spojitý, elektrický signál. (Stahlberg, 2006)



Ani v této době ještě nebyly v dostatečné míře prokázány rozdíly mezi buněčnou anatomií zvířat a rostlin. Odlišnost excitace u rostlin a nervových buněk byla spolehlivě prokázána až při přímém porovnání akčních potenciálů u *Nitelly* (Obr. 3.12) a obrovského axonu olihně (Obr. 3.13).



Obrázek 3.12 *Nitella* spp.<sup>5</sup>



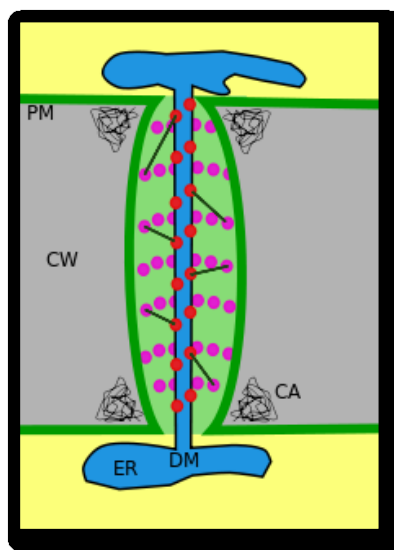
Obrázek 3.13 *Oliheň obecná*.<sup>6</sup>

---

<sup>5</sup> Dostupné z: < [http://durokon.com/store/index.php?main\\_page=page&id=172](http://durokon.com/store/index.php?main_page=page&id=172) > [citováno 18. ledna 2012]

<sup>6</sup> Dostupné z: < <http://ucivo.webnode.cz/album/mekkysi/mekkysi-hlavonozci-olihen-obecna-jpg/> > [citováno 20. ledna 2012]

Dnes úvahy o nervům podobných strukturách u rostlin zahrnují více srovnávacích parametrů. Je známo, že mnohé rostliny umí generovat elektrické signály ve formě akčních potenciálů a pomalých vlnových potenciálů, tzv. variačních potenciálů. Určitého poznání bylo dosaženo i v oblastech šíření těchto potenciálů. S jistotou již můžeme říci, že na dlouhé vzdálenosti se tyto potenciály šíří právě výše zmiňovanými cévními svazky. Také víme, že rostliny jako je mucholapka jsou schopné šířit akční potenciály s vyšší účinností a rychlostí i bez použití cévních svazků, a to pravděpodobně proto, že jejich buňky jsou elektricky propojeny prostřednictvím plasmodesmat (Obr. 3.14).



*Obrázek 3.14 Plasmodesma.*

Jiná analogie s klasickou neurobiologií se nachází u rostlin v kořenovém systému, kde lze v axiální tkáni nalézt vesikuly, označované jako rostlinné synapse. V rostlinných buňkách se nacházejí i řídící látky podobné neurotransmiterům. Pokud bude v následujících letech identifikována přesná funkce těchto látek, na poli rostlinné neurobiologie dojde zajisté k významným zvratům.

Ačkoli se neurobiologie může zdát ucelenou vědou, k jejím poznatkům výrazně přispěla elektrofyzologie a další vědy zabývající se studiem dálkových signálů. Elektrofyzologie jako taková odhalila mnoho rozdílů mezi živočichy a rostlinami, jež se přímo týkaly schopnosti reagovat se na signály z vnějšího prostředí. Dokonce i dnešní době, kdy existují specializovanější obory, jsou výsledky z této oblasti překvapující. Uvádí, že rostliny disponují více typy signálů, které jsou schopny urazit delší vzdálenosti. Dnešní moderní vědy zkoumají mechanismy vzniku, šíření a funkce rostlinných potenciálů neustále. Na poli rostlinné neurobiologie není ještě zdaleka vše vyjasněno.

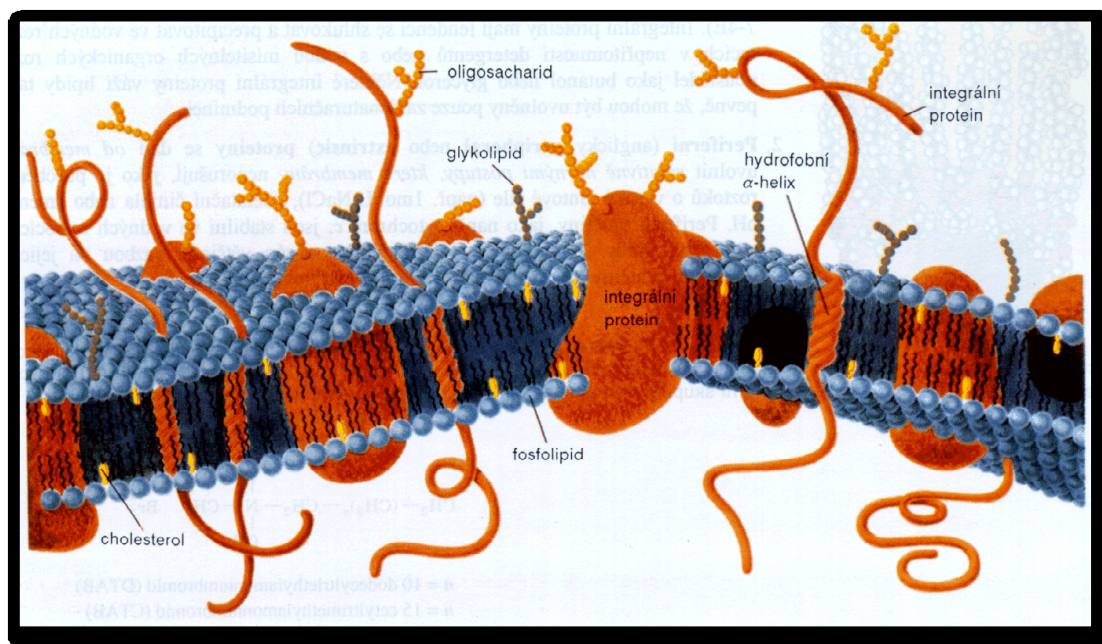
### 3.3 Vznik a šíření rostlinných potenciálů

Elektrické potenciály vznikají v biologických systémech díky koncentračním gradientům iontů tekoucích přes membrány, které obklopují buňky. Tento obecný mechanismus se týká jak zvířat, lidí tak i rostlin. Buněčné membrány jsou semipermeabilní – polopropustné pro určité druhy iontů. Obecně lze tedy říci, že některé ionty přes ni projdou mnohem snadněji než jiné. (Franklin et al., 1984)

#### 3.3.1 Buněčná membrána

Řada fyziologických procesů, které jsou založeny na biofyzikálních dějích, je lokalizována právě na strukturách nazývaných biologické nebo také buněčné membrány. Jedná se především o procesy spojené s transportem a přeměnou látek, přeměnou energie, příjmem, přenosem a zpracováním signálů, syntézou bílkovin a lipidů apod. V živočišné říši rozeznáváme 10 typů membrán, v rostlinné pak 12 typů.

Základními stavebními kameny biologických membrán jsou lipidy a bílkoviny (Obr. 3.15), které tvoří dohromady až 90 % hmotnosti sušiny. Jejich poměr je pro jednotlivé typy membrán a pro jednotlivé živočišné a rostlinné druhy do značné míry specifický. Tento poměr se mění v rozsahu od 4:1 až po 1:3. Součástí biomembrán jsou také sacharidy.



Obrázek 3.15 Schéma biologické membrány.

## LIPIDY V BIOLOGICKÝCH MEMBRÁNÁCH

Lipidy v membránách mají především funkci strukturní a tvoří prostředí bílkovinné složce membrán. Jedná se obecně o látky, které jsou dobře rozpustné v organických rozpouštědlech, ale jen částečně rozpustné nebo úplně nerozpustné ve vodě. Lipidické povahy jsou tuky, oleje, některé vitamíny a hormony a také v neposlední řadě většina nebílkovinných složek biologických membrán.

Základním rysem chemického složení lipidů je, že obsahují řetězec mastné kyseliny esterickou vazbou navázaný na hydroxylovou skupinu alkoholu, kterým je nejčastěji glycerol.

Prakticky všechny lipidy kromě triacylglycerolů patří mezi látky amfifilní povahy, tzn., že molekula lipidu má část hydrofilní (polární hlavičku tvořenou většinou skeletem glycerolu, fosfátovou skupinou a vázanými molekulami alkoholů, derivátů aminokyselin či sacharidů) a hydrofobní (ocas tvořený řetězcem mastné kyseliny). Tato vlastnost je podstatná pro strukturální uspořádání membrány a rovněž ovlivňuje propustnost různých látek přes membránu.

Lipidy mají ve vodném prostředí a rovněž ve fyziologickém roztoku schopnost agregovat a vytvářet různé typy uspořádaných útvarů. Jedná se o tři základní typy, které lze experimentálně zjistit pomocí elektronové mikroskopie, RTG difrakce, NMR, optických metod a kalorimetrie:

1. micely (válce lipidů ve vodě) pro poměr velikosti ocasu a hlavy menší než 0,7,
2. lamelární dvojvrstvu pro poměr velikosti ocasu a hlavy rovný 1,
3. inverzní micely ( $H_{II}$  fáze, válce vody v lipidech) pro poměr velikosti ocasu a hlavy větší než 1,3.

Typ uspořádané struktury je dán vzájemným silovým působením nábojů polárních skupin a prostorovou repulzí řetězců mastných kyselin. Pro fosfoglyceroly a sfingolipidy je typické uspořádání ve dvojvrstvě, zatímco například pro galaktolipidy s velkými polárními skupinami je typická tvorba micel.

Dalšími vlastnostmi lipidů důležitými pro jejich prostorové uspořádání a fyzikální vlastnosti membrán je tzv. lyotropní a termotropní mesomorfismus.

Pro lyotropní mesomorfismus platí, že uspořádání molekul a skupenství závisí na množství rozpouštědla.

Pro termotropní mesomorfismus je charakteristické, že uspořádání molekul a skupenství závisí na teplotě. Při nízkých teplotách se lipidy vyskytují v krystalickém stavu. Při překročení kritické teploty přecházejí do skupenství kapalného a tvoří kapalné krystaly, které jsou základem funkční membrány. Další zvyšování teplot pak vede k vytvoření amorfní hmoty.

Termotropní a lyotropní mesomorfismus se u lipidů kombinují.

Kritická teplota přechodu dvojvrstvy lipidů do fáze kapalného krystalu roste s délkou řetězce mastných kyselin a stupněm nasycení zbytku mastných kyselin ze stejného důvodu jako teplota tání mastných kyselin roste s těmito veličinami. Kritické teploty u většiny biologických membrán leží mezi 10 až 40 °C. Cholesterol funguje dvojím způsobem. Pod kritickou teplotou tekutost membrány zvyšuje (zabraňuje krystalizaci), nad kritickou teplotou tekutost membrány zmenšuje (brání pohybu řetězců mastných kyselin ostatních lipidů). Při vysokých koncentracích cholesterolu dochází k inhibici fázových přechodů v biologických membránách.

Tekutost membrány je do značné míry ovlivňována mírou nenasycenosti mastných kyselin v lipidech. S vyšším výskytem dvojných vazeb tekutost membrány roste a kritická teplota klesá.

Jak již bylo řečeno tekutost biologických membrán (fáze kapalného krystalu) je důležitou fyziologickou vlastností membrán, protože umožňuje interakci bílkovin zanořených v membránách. Kritické teploty přechodu biologických membrán buněk teplokrevných živočichů jsou hluboko pod tělesnou teplotou. Naproti tomu u bakterií, řas, vyšších rostlin a studenokrevných živočichů (ryby a nižší živočichové) je schopnost regulace nasycenosti a nenasycenosti mastných kyselin u lipidů v biologických membránách důležitý adaptační mechanismus zajišťující optimální funkční stav membrány v různých teplotních podmínkách. Například tekutost membrán *Escherichie coli* zůstává konstantní, i když se teplota růstu těchto bakterií mění od 15 do 43 °C.

Pro lipidické membrány je typické, že se často vyskytuje laterální a vertikální rozdělení fází (podle zastoupených lipidů mohou vedle sebe existovat tuhé a tekuté oblasti a rovněž jedna strana membrány může mít rozdílnou tekutost než druhá).

### PROTEINY V BIOLOGICKÝCH MEMBRÁNÁCH

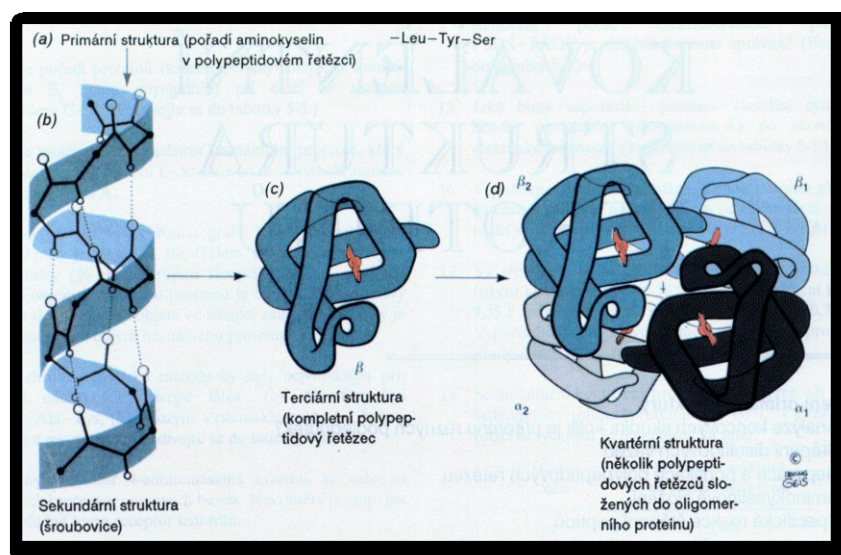
Mají především specifickou katalytickou funkci a působí jako přenašeče látek, energie a nábojů. Ovlivňují ovšem i strukturu membrán a některé, především malé proteiny mají pouze strukturní nebo regulační funkci.

Jedná se o makromolekulární látky ( $M_r > 10\,000$ ). Základními stavebními prvky jsou  $\alpha$  – L aminokyseliny (20 aminokyselin – které svým uspořádáním v peptidickém řetězci určují charakter bílkoviny). Aminokyseliny jsou mezi sebou spojeny peptidickou vazbou karboxy a amino skupiny dvou sousedních aminokyselin. Peptidickou vazbu lze pokládat za rigidní plošný útvar. Charakter peptidové vazby je podle Paulinga důsledkem rezonančních interakcí, které rovněž udělují peptidové vazbě asi 40 % charakter dvojné vazby. Z tohoto důvodu je rovněž peptidová vazba C – N o 14 pm kratší než jednoduchá vazba C – N u volných aminokyselin a naopak vazba C = O je o 2 pm delší než u klasických aldehydových a ketonových vazeb.



Obecně u proteinů hovoříme o čtyřech úrovních hierarchie struktury (Obr. 3.16):

1. **Primární struktura** – charakterizuje pořadí (sekvenci) aminokyselin jednotlivých polypeptidových řetězců.
2. **Sekundární struktura** – charakterizuje prostorové uspořádání části polypeptidového řetězce aminokyselin bez ohledu na interakce s ostatními částmi řetězce či jinými řetězci polypeptidů.
3. **Terciální struktura** – charakterizuje prostorové uspořádání kompletního polypeptidového řetězce se zahrnutím interakcí mezi jednotlivými částmi tohoto řetězce, tj. prostorové uspořádání jednotlivých částí řetězce vůči sobě.
4. **Kvartérní struktura** – charakterizuje vzájemné prostorové uspořádání polypeptidových řetězců u bílkovin složených z několika podjednotek.

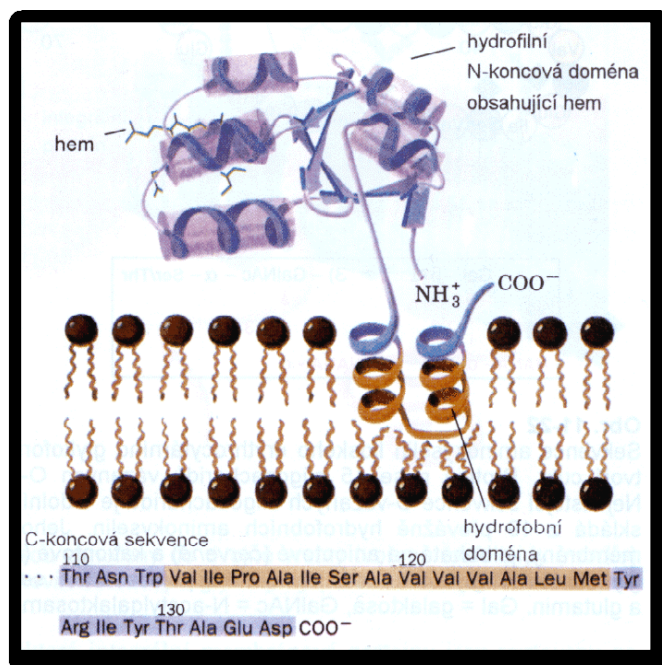


Obrázek 3.16 Schématické zobrazení strukturní hierarchie bílkovin.

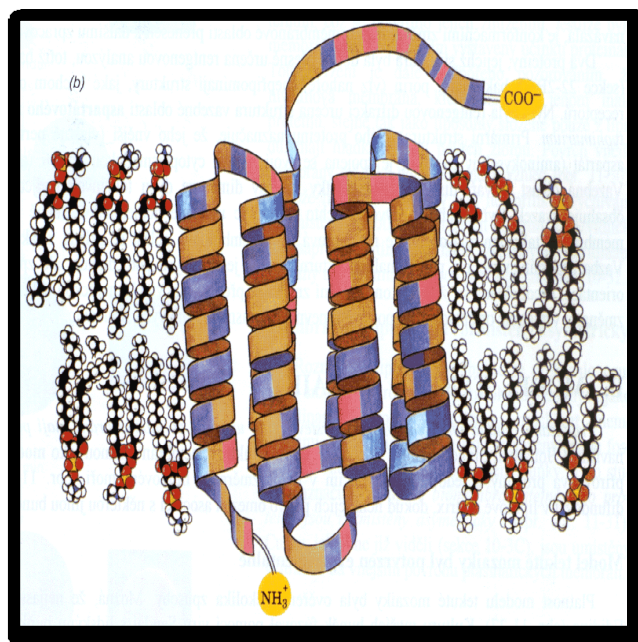
Je třeba si uvědomit, že struktura proteinů na všech čtyřech úrovních navzájem spolu souvisí a do značné míry je dána již primární sekvencí aminokyselin.

Podle způsobu zabudování do membrány rozeznáváme periferní a integrální bílkoviny. Bílkoviny periferní bývají k membráně vázány pouze elektrostatickými interakcemi a vodíkovými můstky. Tyto periferní bílkoviny lze tedy snadno extrahovat do roztoku postupy, které nerozrušují membránu (například působením roztoků o vysoké iontové síle, změnami pH, chelatačními činidly). Periferní proteiny (například cytochrom c) jsou stabilní ve vodných roztocích a nevážou lipidy. Často bývají podjednotkami složitých komplexů. Naproti tomu bílkoviny integrální vyžadují ke svému uvolnění detergenty, které rozrušují membránu (tensidy, chaotropní činidla). Je pro ně charakteristické, že ve svém polypeptidovém řetězci mají alespoň jednu nepolární hydrofobní část,

kterou se zanořují do lipidové dvojvrstvy (Obr. 3.17). Často se jedná o bílkoviny transmembránové, které prostupují z jedné strany dvojvrstvy na druhou (Obr. 3.18). Integrální proteiny vesměs vážou lipidy a ve vodných roztocích mají tendenci vytvářet shluky (agregáty) a srážet se.



Obrázek 3.17 Zakotvení integrálního proteinu v membráně.



Obrázek 3.18 Zakotvení transmembránového proteinu v membráně.

## STRUKTURA BIOMEMBRÁN

Základní představy o struktuře biologických membrán byly formulovány v letech 1925 – 1935. V této době bylo prokázáno, že v přírodních membránách převažuje uspořádání lipidů do dvojvrstvy. Základní charakteristikou této dvojvrstvy je, že tvoří difusně osmotickou bariéru, nepropustnou především pro látky rozpustné ve vodě.

V současné době jsou představy o struktuře membrán shrnuty v modelu tekuté membránové mozaiky. V lipidické dvojvrstvě o konzistenci tekutého krystalu jsou zanořeny bílkoviny. Determinace uspořádání bílkovin v lipidové matici je dána řadou faktorů:

- ❖ tvorbou domén s jinou než dvojvrstevnou strukturou,
- ❖ tvorbou složitých bílkovinných komplexů,
- ❖ laterální separací fází.

V takové struktuře můžeme mozaiku chápat jako:

- mozaiku proteinů v lipidech,
- mozaiku lipidů v lipidech - v jedné membráně může existovat více než 100 lipidických sloučenin. Poměr v jakém jsou zastoupeny je specifický pro každý typ membrán,
- mozaiku proteinů v proteinech - může dojít k promíchání nebo naopak k separaci jedněch membránových proteinů s druhými.

V lipidové dvojvrstvě mají membránové komponenty značnou pohyblivost. Rozeznáváme čtyři základní možnosti pohybu membránových komponent:

1. Brownův pohyb a difuze v laterálním směru,
2. postupný pohyb v ose kolmé na povrch,
3. rotační pohyb kolem vertikální osy kolmé k povrchu membrány,
4. rotační pohyb kolem os v rovině membrány.

Jednotlivé typy pohybu membránových komponent mohou být ovlivněny následujícími mechanismy:

- může docházet k asociaci a agregaci membránových komponent jak v rovině membrány, tak vertikálně,
- pohyblivost bílkovin může být omezena kolizemi s jinými proteiny,
- pohyblivost může být ovlivněna vazbou ligandů na vnější nebo vnitřní povrch membrány,



- pohyblivost komponent buněčné membrány může být řízena tzv. cytoskeletární soustavou buňky, která interaguje s cytoplasmatickým povrchem membrány specifickými periferními adhezivními proteiny.

Pro membránu je rovněž charakteristická tzv. strukturní asymetrie membrán, tj. vnější a vnitřní strana membrány má jiné složení lipidů i proteinů. Tato asymetrie membrán je doprovázena rovněž asymetrií funkcí.

Buněčné membrány se neustále rozpadají a obnovují. Například u mikroorganismu *Vacuolaria virescens* se membránové struktury kompletně obmění za dobu řádově 10 min. Membrány se tvoří růstem a diferenciací již existujících membrán (žádná buněčná membrána tedy nevzniká *de novo*). Na základě těchto skutečností říkáme, že membránové útvary mají plynulou časovou a většinou i prostorovou kontinuitu, z čehož pak vyplývá kontinuita funkcí.

### 3.3.2 Klidový membránový potenciál

Membránový potenciál je rozdíl (gradient) elektrického potenciálu mezi dvěma stranami buněčné membrány. Z fyzikálního hlediska jej můžeme definovat jako napětí na semipermeabilní membráně. Je nedílnou součástí mechanismů udržujících celkovou rovnováhu buňky. Mezi základní fyziologické ionty, které se podílejí na vytváření membránového potenciálu, patří draslík, sodík, chlór a u rostlin i vápník. Buňky udržují rozdílnou koncentraci iontů na obou stranách plasmatické membrány pomocí pump specifických pro jednotlivé ionty.

Každá živá buňka vytváří v podmínkách fyziologického klidu tzv. klidový membránový potenciál, který je výsledkem již uvedeného nerovnoměrného rozdělení iontů po obou stranách buněčné membrány. Hodnota klidového membránového potenciálu u různých buněk kolísá v rozmezí asi -50 mV až -100mV.

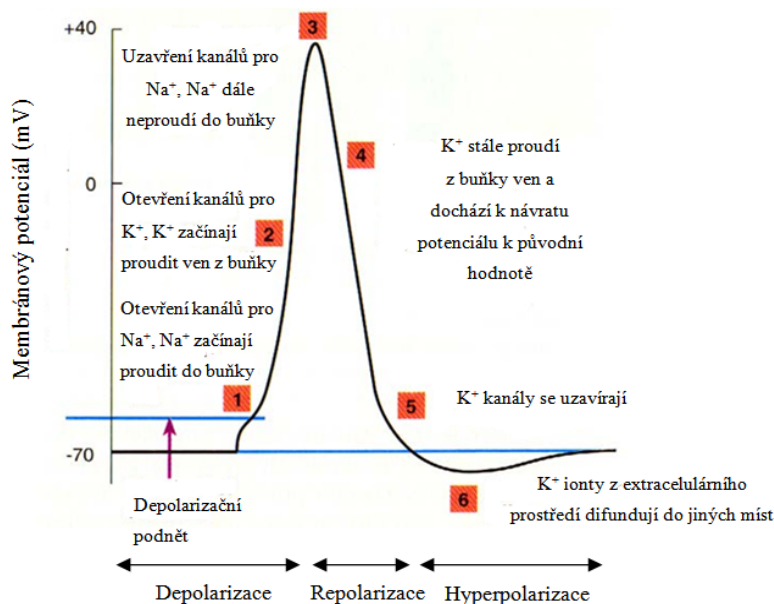
Velikost klidového membránového potenciálu je přibližně rovna hodnotě rovnovážného potenciálu draselných iontů dle Nernstovy rovnice:

$$V_k = \frac{RT}{F} \cdot \ln \frac{[K^+]_e}{[K^+]_i} \quad (3.1)$$

### 3.3.3 Akční potenciál

Akční potenciály jsou rychle se šířící elektrické signály, které jsou známy především u zvířat. Šíří se podél axonů nervové soustavy a po povrchu některých svalových a žlázových buněk. U axonů jsou akční potenciály krátkodobé, šíří se konstantní rychlostí a s konstantní amplitudou. Jedná se o místní přechodnou změnu membránového potenciálu, ke které dohází na buněčné membráně. (Fromm et Lautner, 2007)

Proces vzniku akčního potenciálu začíná otevřením iontových kanálů pro sodíkové kationty. Sodíkové kationty začnou rychle proudit do nitra buňky (propustnost membrány pro  $\text{Na}^+$  kationty se zvýší o cca 500%), což způsobí rychlý překmit hodnoty membránového potenciálu směrem ke kladným hodnotám. Následně dojde k depolarizaci membrány. Téměř současně se otvírají i iontové kanály pro draselné kationty. Draselné kationty proudí z nitra buňky do jejího okolí. Tímto se zastaví kladný překmit potenciálu a dojde k ustálení tzv. hrotového potenciálu či napětí a k následnému poklesu. Fáze poklesu se označuje jako repolarizace. Hodnota potenciálu na membráně však klesá až pod původní hodnotu a dochází k hyperpolarizaci. Doba trvání hyperpolarizační fáze odpovídá refrakterní době, tedy době, po kterou nemůže dojít ke vzniku dalšího akčního potenciálu. Průběh akčního potenciálu můžeme tedy rozdělit na tři základní fáze: depolarizace, repolarizace a hyperpolarizace (Obr. 3.19). (Fromm et Lautner, 2007)



Obrázek 3.19 Průběh akčního potenciálu.

Akční potenciál lze považovat za funkční projev aktivní membrány. Pro vznik akčního potenciálu je nutné, aby byl v membráně dostatečný počet napětově řízených kanálů, a aby na danou membránu dorazil nadprahový podnět. Generace akčního potenciálu se řídí pravidlem „vše nebo nic“ – tzn., že akční potenciál buď vznikne, nebo ne. Poté co stimul dosáhne určité hodnoty, která způsobí depolarizaci membrány, tak ani další nárůst stimulu neovlivní amplitudu ani tvar vzniklého akčního potenciálu. Odpovědí na stimul je tedy depolarizace, ke které buď dojde, nebo nedojde (pravidlo vše nebo nic). Tato odpověď se pasivně šíří z excitované oblasti do sousedních neexcitovaných oblastí. (Fromm et Lautner, 2007)

Zatímco iontový mechanismus vzniku akčních potenciálů u zvířecích membrán závisí na vstupu sodíkových kationtů do buňky a výstupu draselných kationtů z buňky, u rostlinných membrán se na tomto jevu podílí jiné ionty, a to vápenaté, chloridové a draselné. Akční potenciály rostlin byly intenzivně studovány na obrovských internodálních buňkách zelených řas *Chara* a *Nitella*. Tyto buňky vykazují intenzivní protoplasmatický průtok, který je zastaven šířením akčních potenciálů o rychlosti  $10 - 20 \text{ mm s}^{-1}$ . U řasy *Chara* byl nalezen iontový kanál pro draselné kationty, který by se mohl hrát roli v repolarizační fázi průběhu akčního potenciálu. Jelikož napětově řízené kanály rostlin vyžadují zvýšenou cytoplasmatickou koncentraci vápenatých kationtů, považuje se aktivace kanálů propouštějících tyto vápenaté ionty za inicializační krok předcházející vzniku akčního potenciálu (Hedrich a Becker, 1994). Nárůst intracelulární koncentrace vápenatých iontů byl pozorován jako reakce na různé stimuly, kterým byly rostliny vystaveny (Knight et al., 1991). U internodálních buněk řasy z rodu *Chara* vápenaté kationty aktivují kanály pro chloridové anionty. Vápenaté kationty se během akčního potenciálu uvolňují z především z vnitřních prostorů (Plieth et al., 1999). Kombinace činnosti vápenatých, chloridových a draselných kanálů umožňuje rostlinným buňkám odpovídat na měnící se podmínky vnějšího prostředí změnami jejich elektrické aktivity.

Přenášená informace může být kódována tvarem dílčího akčního potenciálu určeného relativními příspěvky iontových vodivostí v klidu nebo frekvencí potenciálů.

U vyšších rostlin je klasickým zástupcem, na kterém je možné demonstrovat vedení akčního potenciálu, *Mimosa pudica*, u které je vedení akčního potenciálu spojováno se skládáním jejích složených listů (Obr. 3.20). Stimulem může být například rychlé ochlazení apikálního konce složeného listu. Takový stimul vyvolá akční potenciál, trvající asi 5 sekund, šířící se bazipetálně osou složeného listu rychlostí  $20 - 30 \text{ mm s}^{-1}$ . Tato rychlost šíření je velmi podobná rychlosti šíření akčního potenciálu v nervech *Anodonta* ( $45 \text{ mm s}^{-1}$ ), ale je mnohem menší než u nervů chobotnice ( $3 \text{ m s}^{-1}$ ) nebo u nervů savců (více než  $100 \text{ m s}^{-1}$ ) (Kluge a Bauer, 2005). Je evidentní, že skládání složených listů u *Mimosy* je způsobeno právě šířením akčního potenciálu. Když se akční potenciál dostane

k pulvinusu<sup>7</sup>, je přenášen laterální cestou skrze plasmodesmata do buněk motorické kůry. Tyto buňky odpovídají na signál výtokem iontů spojeným s výtokem vody, který následně způsobí pohyby listů.



Obrázek 3.20 Skládání složených listů u *Mimosy pudicy*.

Další odlišností mezi šířením akčních potenciálů u rostlin a zvířat je délka refrakterní doby, čili fáze hyperpolarizace. Refrakterní doba u rostlinných buněk je mnohem delší než u buněk živočišných. Absolutní refrakterní doba u savčích nervových buněk trvá přibližně 0,05 ms, zatímco u námi již dobře známé řasy *Chara* se pohybuje v rozmezí 4 – 40 s a v rozmezí 2 – 4 minut u *Conocephalum*. Relativní refrakterní doba u savčích nervů trvá 0,001 – 0,01 s, u řasy *Chara* 60 – 150 s a u *Conocephalu* 6 – 8 minut. (Dziubinska et al., 1983)

### 3.3.4 Variační potenciál

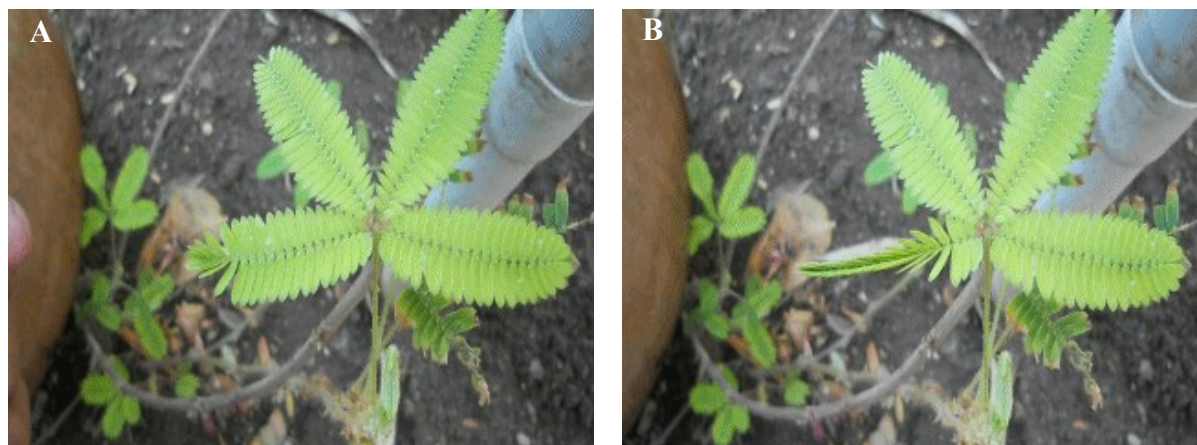
Variační potenciály nebo také pomalé potenciály jsou šířící se elektrické potenciály, které se skládají z přechodných změn membránového potenciálu (depolarizace a repolarizace). Od rychlých akčních potenciálů se liší především délkou trvání a fází repolarizace, která je u těchto pomalých změn napětí zpožděná. Další odlišností je jejich variabilita. Tento pomalo vlnný signál se mění s intenzitou působícího stimulu, nevzniká samovolně a projevuje se jako lokální změna, buď hydraulického tlaku, nebo chemických látek, přenášená mrtvým xylémem. Může být vyvolán zraněním, ztrátou některého z orgánů rostliny nebo popálením (Stahlberg a Cosgrove, 1992, 1994).

---

<sup>7</sup> Pulvinus - skupina buněk v bázi listu některých rostlin, které kvůli rychlým ztrátám vody mění rozložení svých listů

Vznik a průběh variačních potenciálů byl studován na mnoha hospodářsky využívaných rostlinných druzích, jako je například okurka, rajče, slunečnice nebo hrách. Studie těchto potenciálů však probíhaly i na dřevnatých druzích, a to například na révě vinné (Mancusco, 1999).

Variační potenciál je charakterizován amplitudami a rychlostmi, které klesají s narůstající vzdáleností od místa poranění. Dále je pro něj typická schopnost procházet mrtvými oblastmi tkáně a závislost na napětí xylému. Napětí xylému je zanedbatelné při saturační vlhkosti. Za těchto podmínek však variační potenciál nevzniká. Jak již uvádím výše, variační potenciály se také nazývají pomalo vlnnými potenciály („slow wave potential“) a to díky jejich velmi pomalé repolarizační fázi. Iontový mechanismus variačních potenciálů se liší od základního mechanismu vzniku akčních potenciálů. Předpokládá se, že zahrnuje přechodné vypnutí  $H^+$  ATPasy typu P v plasmatické membráně (Stahlberg et al, 2006). Například u *Mimosy pudicy* odtržením vrcholu zpeřeného listu vzniká v ose tohoto složeného listu variační potenciál, který má nepravidelný charakter a mnohem delší délku trvání než akční potenciál (Fromm et Lautner, 2007). Na rozdíl od akčního potenciálu, variační potenciál může procházet i sekundárním pulvinusem na bázi zpeřeného listu. Dále se pohybuje do tří sousedních částí zpeřeného listu, což následně způsobí jeho složení směrem k ose listu (Obr. 3.21).



Obrázek 3.21 A) Zpeřený list *Mimosy pudicy* před průchodem variačního potenciálu. B) Zpeřený list *Mimosy pudicy* po průchodu variačního potenciálu.

Jelikož může variační potenciál procházet jak primárním tak sekundárním pulvinusem, dochází k pohybům listů na celé rostlině. Tento pomalý potenciál se tedy šíří skrze celou rostlinu, zatímco vedení akčních potenciálů je omezeno pouze na krátkou vzdálenost, např. jeden dílčí list složeného listu.

### 3.4 Způsoby přenosu elektrických signálů

Poté co elektrický signál vznikne v symplastu<sup>8</sup> šíří se dále skrze plasmodesmata do všech dalších symplastických buněk. Elektrické propojení buněk bylo prokázáno již v roce 1967 Spanswickem a Costertonem. Tito vědci propojili rostlinnou buňku se zdrojem proudu. Poté se snažili tento proud dohledat v jiných buňkách této rostliny, což se jim také podařilo. V rámci jiného experimentu byl potvrzen i přenos signálu skrze plasmodesmata. Pokud je informace přenášena do vzdálenějších částí rostliny, signál se přenáší přes floém<sup>9</sup>. Floém prochází spojitě celou rostlinou. Základní elementy floému, sítkovice, jsou obecně považovány za méně rezistentní vůči průchodu akčních potenciálů. Díky relativně velkým sítkovicovým pórům a kontinuitě plasmatické membrány a endoplasmatického retikula se sítkovice zdají být dostatečně vhodné elektrickou signalizací na větší vzdálenosti. U mnoha rostlinných druhů jsou cévní svazky obklopeny sklerenchymatickou vrstvou za účelem omezení vstupu elektrického signálu do floému. Například v řapíku *Mimosy* je floém obklopen takovou bariérou. Nízký stupeň elektrického propojení v laterálním směru zapříčiněn přítomností pouze malého množství plasmodesmat na rozhraní průvodních buněk a floémových parenchymatických buněk také usnadňuje signalizaci na delší vzdálenosti. (Fromm et Lautner, 2007)

Přenosu elektrického signálu podél sítkovic je dosaženo díky činnosti iontových kanálů v jejich plasmatických membránách. Některé tyto kanály byly přesně identifikovány. Jednalo se především o iontové kanály přenášející draselné kationty. Dále bylo zjištěno, že membránový potenciál sítkovic je dán majoritně vodivostí draselných kationtů. Již dříve zmiňované iontové kanály pro transport vápenatých kationtů byly v sítkovicích nalezeny také. Všechny tyto skutečnosti napovídají, že sítkovice mohou být tou pravou cestou pro přenos elektrických signálů na dlouhé vzdálenosti. (Fromm et Lautner, 2007)

Je samozřejmé, že tyto domněnky nedaly mnoha vědcům spát, a proto byl navržen velmi zajímavý experiment, který vedení elektrických signálů floémovou cestou potvrdil. Tento pokus spočíval v použití mšic, které se při nabodnutí rostlinné tkáně vždy trefí právě do floému. Konkrétně bylo použito k měření pouze jejich sacího ústrojí, jelikož po nabodnutí byla mšice odstraněna použitím pulsního laseru. Na zapíchnuté sací ústrojí, zajišťující kontakt s floémem, byla přiložena

---

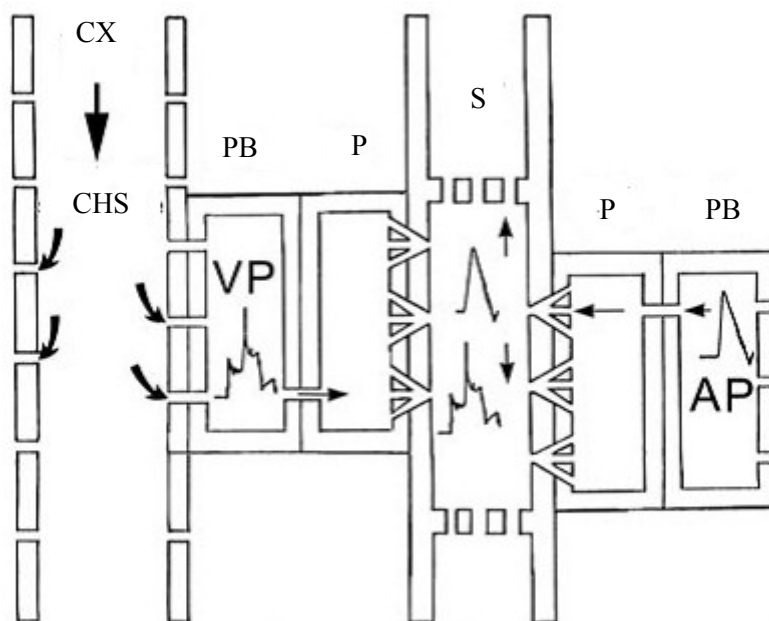
<sup>8</sup> Symplast - soubor propojených protoplastů v rostlinném těle. Veškerá protoplazma rostlinného těla vzájemně propojená pomocí cytoplazmatických spojení – plasmodesmat.

<sup>9</sup> Floém - pletivo sloužící k transportu asimilátů z místa zdroje (většinou listy) k místům spotřeby nebo zásob (angl. *sink*, kořeny, vegetační vrcholy hlízy, plody ...). Hlavním vodivým elementem floému jsou buňky sítkovice. Vytvářejí se z dělivého pletiva – tzv. kambia na jeho vnější straně. U rostlin, které druhotně tloustnou (např. dřeviny) floém tvoří lýko. Kromě sítkovic tvoří důležitou součást floému tzv. průvodní buňky.

mikroelektroda, z které byl následně snímán signál. Tímto způsobem se podařilo proměřit signály šířící se floémem i na vzdálenost větší než dvacet centimetrů. (Fromm a Bauer, 1994; Lautner et al., 2005)

Depolarizace variačních potenciálů vznikají prudkým poklesem napětí v cévách xylému po poranění rostliny. Tato hydraulická vlna je přenášena do lokálních změn toku iontů skrze podráždění mechanosenzorických kanálů přilehlých buněk (Stankovic et al., 1998; Davies a Stankovic, 2006). Po vzniku se variační potenciál může šířit laterálně přes plasmodesmata, dále může prostupovat do sítkovic, odkud se signál dostává do vzdálených částí rostliny (Fromm a Lautner, 2006). Přenos variačního potenciálu mohou způsobit také některé chemické látky, které se uvolňují a prostupují rostlinou během jejího poranění. Tyto chemické látky pak nedráždí mechanosenzorické kanály, ale iontové kanály aktivované vazbou ligandu (Fromm a Lautner, 2006).

Obecně lze tedy říci, že přenos signálu rostlinnou tkání v laterálním směru závisí na elektrické vodivosti plasmodesmat a v longitudinálním směru závisí na elektrickém propojení sítkovic (Fromm a Lautner, 2006). Schématické znázornění způsobů šíření elektrických signálů je na obr. 3.22.



Obrázek 3.22 Schématické znázornění průchodu elektrických signálů rostlinným pletivem. Akční potenciál (AP) se po svém vzniku v parenchymatických buňkách (PB) šíří pouze na krátkou vzdálenost. Poté co se AP přes průvodní buňky (P) floému dostane do sítkovic (S) může se šířit i na dlouhé vzdálenosti. Variační potenciál (VP) vznikající v parenchymatických buňkách v blízkosti xylémových cév, kterými se šíří buď hydraulická vlna nebo chemická substance (CHS), uvolněná při poranění. (převzato a upraveno z Fromm et Lautner, 2007)

### 3.5 Fyziologické aspekty evokovaných signálů

Přestože variační i akční potenciál vzniká odlišnými indukčními mechanismy, tak jsou oba tyto potenciály schopny informovat vzdálené buňky rostlinné tkáně o lokálních podnětech. Rostlinné elektrické signály mají mnoho různých fyziologických funkcí, které se druh od druhu liší. U některých rostlinných druhů převládá spíše signalizace na kratší vzdálenosti než signalizace na vzdálenosti dlouhé. Příkladem rostlin, které jsou charakterizovány signalizací na kratší vzdálenosti, jsou hmyzožravé rostliny. K hmyzožravým rostlinám patří například Rosnatka (*Drosera spp*) a Mucholapka (*Dionea*), které žijí v oblastech chudých na dusík. Akční potenciály využívají ve speciálních listových pastech, do kterých chytají hmyz, z něhož získávají tolik potřebný dusík (Sibaoka, 1969). U Mucholapky začíná odchyt hmyzu uvolněním vápenatých kationtů do cytosolu senzorických buněk v reakci na první mechanické podráždění chloupků pasti do dosednutí hmyzu. Následně vzniká akční potenciál, který nevyvolá žádnou odpověď pasti. Pokud je do 40 s od prvního podráždění stimulován další chloupek pasti, dojde ke vzniku druhého akčního potenciálu, který již vyvolá uzavření. Po uzavření pasti se začnou vylučovat trávicí enzymy, které ulovenou kořist rozloží. Tento dvoustupňový proces chrání rostlinu před působením náhodných stimulů. (Fromm et Lautner, 2007)

Dalším fyziologickým efektem vyvolaným vznikem potenciálu je nárůst respirace. Dráždivým stimulem je v tomto případě oddělení rostlinného orgánu. Změny respirace byly pozorovány u sazenic bobu obecného po opylení květů (Fromm, Hajirezaei a Wilke, 1995). U ibišku samoopylení indukuje vznik série akčních potenciálů, což následně způsobí přechodný nárůst rychlosti ovariální respirace. Rostlina touto dočasnou změnou metabolismu signalizuje připravenost k fertilizaci. V kontrastu se vznikem celé série akčních potenciálů podráždění blizny chladovým stimulem vyvolá genuzi pouze jednoho akčního potenciálu, který trvá různě dlouhou dobu. Oba tyto podněty vyvolávají spontánní pokles rychlosti ovariální respirace a redukují koncentraci metabolitů (Fromm et al., 1995).

Se signalizací na delší vzdálenosti, tedy floémovou cestou, se můžeme setkat u mnoha rostlinných druhů. Kupříkladu u kukuřice, akční potenciály, vzniklé po znovu zalití vyschlé půdy, způsobí zvýšení plynové výměny oxidu uhličitého a vody v listech (Fromm a Fei, 1998). Akční potenciály generované ochlazením vrcholku listu kukuřice pro změnu redukují floémový transport do vzdálených listů. K fyziologickým projevům patří také skládání zpeřených listů u *Mimosy*. Tento jev vzniká v důsledku akčního i variačního potenciálu. Rostlina s poskládanými listy vypadá jako mrtvá. Jedná se tedy o určitý druh obranného mechanismu před herbivory. Elektrické signály u *Mimosy* ovlivňují i fotosyntézu (Koziolek et al. 2004).



Elektrická komunikace akčními a variačními potenciály může vyvolat mnoho dalších fyziologických změn. O daném fyziologickém projevu rozhoduje druh rostliny, podnětu a i vzdálenost, na kterou se generovaná informace šíří. Několik dobře prozkoumaných jevů shrnuje tabulka 3.1.

*Tabulka 3.1 Fyziologické jevy vyvolané genezí akčních či variačních potenciálů. (AP – akční potenciál, VP – variační potenciál) (převzato a upraveno dle Fromm a Lautner, 2007)*

Podnět	Druh potenciálu	Rostlina	Fyziologický projev
Mechanický	AP	<i>Dionea</i>	Uzavření pastí, uvolnění trávicích enzymů
Mechanický	AP	<i>Drosera</i>	Pohyb tentakulí
Ochlazení	AP	<i>Mimosa</i>	Regulace pohybu listů
Elektrický	AP	<i>Chara</i>	Zastavení cytoplasmatického toku
Elektrický	AP	<i>Conocephalum</i>	Nárůst respirace
Opylení	AP	<i>Hibiscus</i>	Nárůst respirace
Zavlažení	AP	<i>Zea</i>	Pokles plynové výměny
Ochlazení	AP	<i>Zea</i>	Redukce floémového transportu
Elektrický	AP	<i>Luffa</i>	Pokles elongačního růstu stonku
Elektrický	AP	<i>Lycopersicon</i>	Indukce exprese genu <i>pin2</i>
Zahřátí	VP	<i>Lycopersicon</i>	Indukce exprese genu <i>pin2</i>
Zahřátí	VP	<i>Vicia</i>	Nárůst respirace
Zahřátí	VP	<i>Solanum</i>	Biosyntéza kyseliny jasmonové
Poranění	VP	<i>Pisum</i>	Inhibice syntézy proteinů
Zahřátí	VP	<i>Mimosa</i>	Přechodný pokles fotosyntézy

## 4 Způsoby měření potenciálů

Pro měření rostlinných potenciálů lze použít dvě základní techniky, extracelulární a intracelulární měření. Každá z těchto dvou metod má svá pro a proti. Způsob měření je tedy nutné vybírat dle konkrétní aplikace. Extracelulární technika byla široce používána především v minulosti. Její největší výhodou je především délka měření potenciálů, která se může pohybovat i v řádu několika dní. Zatímco u intracelulárního snímání, u něhož se využívají skleněné penetrační mikroelektrody, je délka měření cca 1 – 2 hodiny. Obecně je intracelulární měření i přes krátkou dobu snímání považováno za preciznější než záznam extracelulární. (Fromm et Lautner, 2007)

### 4.1 Extracelulární měření

Tento typ měření je známý již mnoho let díky používání v oblastech živočišné elektrofyziologie. Extracelulární snímání spočívá v měření sumy bioelektrické aktivity velké skupiny buněk. V lékařské praxi se stejného principu využívá například při záznamu elektrické aktivity srdce (EKG) nebo mozku (EEG). U vyšších rostlin používáme dva základní typy extracelulárních technik, a to snímání z povrchu nebo měření využívající vpichové kovové elektrody.

Technika využívající vpichové elektrody, které jsou obvykle vyrobeny ve formě stříbrných drátků pokrytých chloridem stříbrným, poškozují rostlinnou tkáň, jejíž potenciály mají být zaznamenávány. Po zavedení do výhonků nebo žil listů se elektrody dostávají do kontaktu s rostlinou tkání, čili velkou skupinou buněk.

Na druhou stranu, povrchové snímání potenciálů má také své výhody. Hlavním plusem je především neinvazivita a stabilita této techniky. Tento způsob měření potenciálů se velmi často používá v kombinaci s dalšími metodami pro studium dalších fyziologických jevů, kupříkladu snímání výměny plynů. Pro povrchová měření jsou k dispozici různé druhy elektrod. Některé elektrody se skládají ze stříbrného vlákna pokrytého vrstvou chloridu vápenatého a jsou zvlhčeny 0,1 % (w/v) KCl v agaru. Tyto elektrody jsou kvůli zajištění dobrého kontaktu s rostlinnou tkání zabaleny do bavlny (Fromm et Spanswick, 1993). K dalším povrchovým elektrodám patří tabletové elektrody, které k zajištění vodivého spojení mezi rostlinnou tkání a elektrodou využívají vodivý gel (gel používaný pro EKG vyšetření). Povrchové elektrody je možné umístit na jakoukoli část rostliny. Referentní elektroda může být umístěna přímo do půdy nebo do misky květináče. Tímto způsobem je možné získat multikanálový záznam potenciálových rozdílů. Měření evokovaných potenciálů – vyvolaných – může začít až po ustálení hodnot potenciálů na jednotlivých elektrodách. Po této stabilizaci lze provést

stimulaci rostliny různými podněty. Elektrická odpověď na apikální stimul by měla být zaznamenána všemi zapojenými elektrodami a to směrem shora dolů.

## 4.2 Intracelulární měření

Pro intracelulární měření membránových potenciálů a evokovaných elektrických signálů se obvykle používají skleněné mikroelektrody s průměrem špičky menším než 1  $\mu\text{m}$ . Tyto skleněné duté elektrody jsou naplněny roztokem KCl, do kterého jsou zavedeny tenké Ag/AgCl elektrody. Samotným měřicím zařízením je zesilovač s vysokou vstupní impedancí. Před začátkem samotného intracelulárního měření musí být zesilovač vynulován na hodnotu, kdy jsou obě mikroelektrody umístěny mimo měřenou buňku. Poté je jedna z mikroelektrod zavedena pomocí mikromanipulátoru do buněčné cytoplasmy nebo vakuoly a druhá, referentní, zůstává v roztoku obklopujícím buňku. Když mikroelektroda projde buněčnou membránou, zesilovač zaznamená negativní změnu potenciálu. Tato hodnota odpovídá klidovému membránovému potenciálu buňky a pohybuje se v rozmezí od -80 do -200 mV podle druhu měřené rostlinné buňky. (Fromm et Lautner, 2007)

Intracelulární měření intaktních sítkovic, floémových elementů, jež usnadňují komunikaci na dlouhé vzdálenosti, je velmi důležité pro detekci signálů šířících se vysokou rychlostí. Realizace takového měření je o něco náročnější než klasické intracelulární měření jedné buňky v roztoku, protože floém je lokalizován uvnitř rostlinného těla a mikromanipulátorem musí být elektroda zavedena až do těchto míst. Problémem takového měření je především kontrola správné pozice mikroelektrody. Příprava měření je poměrně časově náročná. Elektroda musí být umístěna do floému, což je kontrolováno pomocí mikroskopu. Jelikož se to velmi často nedařilo, byla vyvinuta poměrně zajímavá alternativa využívající sacího ústrojí mšic. Tato experimentální metoda je již zmíněna v kapitole 3.4 Způsoby přenosu elektrických signálů.

## 5 Měření biopotenciálů a jejich objektivizace

V rámci této diplomové práce jsme se rozhodli změřit evokované potenciály sady rostlin, a to konkrétně rajčete tyčkového (*Lycopersicon lycopersicum*) odrůdy Tornádo. Naměřená data jsme srovnávali vzhledem ke zvolenému parametru charakterizujícímu stav rostliny.

### 5.1 Materiál

Rostlinným materiálem, na kterém probíhala měření evokovaných potenciálů, bylo rajče tyčkové (*Lycopersicon lycopersicum*) odrůdy Tornádo (Obr. 5.1). Tuto rostlinu jsme vybrali hned z několika důvodů. Jedním z důvodů výběru právě této rostliny byl fakt, že na tomto druhu již měření biopotenciálů v minulosti probíhalo (Ilík et al., 2010). Dalšími důvody byla její dostupnost, cena a také hospodářský význam.



Obrázek 5.1 Rajče tyčkové (*Lycopersicon lycopersicum*) odrůdy Tornádo.

Botanicky patří do čeledi *Solanaceae* – lilkovité. Vytvářejí zpravidla keřiky, na jejichž koncích se tvoří žluté květy a následně plody uspořádané v tzv. vijanech. Rajčata dělíme podle vzrůstu na keříčková a tyčková. Rajče tyčkové je indeterminantní, což znamená, že má neomezený růst hlavní osy. Jedná se jednoletou, samosprašnou rostlinu. Plodem rajčete je vícekomorová bobule.

Rostliny rajčete tyčkového (*Lycopersicon lycopersicum*) odrůdy Tornádo byly odkoupeny od místního pěstitele. Šestitýdenní zakoupené sazenice byly pěstovány ve skleníku temperovaném na

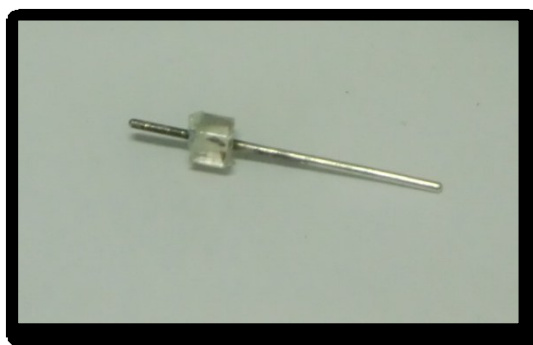
teplotu 20 °C. Tyto rostliny měřily přibližně 15 cm. Jelikož se jednalo o soukromý skleník, nemáme informace o vlhkosti ovzduší či světelných podmínkách, za kterých byly testované rostliny pěstovány. Sazenice jsme ihned po zakoupení přesadili do nového zahradnického substrátu a řádně jsme je zalili běžnou vodou z vodovodního kohoutku. Poté byly rostliny převezeny do laboratoře biofyziky přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, kde probíhalo samotné měření.

## 5.2 Zařízení pro měření rostlinných potenciálů

Pro měření biopotenciálů rajčete tyčkového (*Lycopersicon lycopersicum*) odrůdy Tornádo jsme používali aparaturu pro měření biopotenciálů, patřící přírodovědecké fakultě Univerzity Palackého v Olomouci. Toto zařízení není komerčně dostupné, jelikož většina jeho částí byla zkonstruována RNDr. Pavlem Krchňákem, Ph.D.

### 5.2.1 Příprava měření

Měření bylo prováděno extracelulárně. Pro snímání variačních potenciálů byly vyrobeny speciální argentochloridové elektrody. Jednalo se o stříbrné drátky, na jejichž konce byl napařen chlorid stříbrný (Obr. 5.2).



Obrázek 5.2 Argentochloridová elektroda pro extracelulární měření.

Jelikož je v průběhu měření potřeba zajistit trvalý a velmi stabilní kontakt mezi povrchem listu a povrchovou Ag/AgCl elektrodou, byly navrženy speciální klipsy, určené pro šetrné uchopení listu a stabilizaci kontaktu. Tyto klipsy byly vyrobeny z plošek plastového skla a standardních klipů dodávaných k přístroji PAM (Obr. 5.3). Jednotlivé klipsy uchycené do křížových svorek byly připevněny k laboratornímu stojanu. Všechny tyto stabilizační prvky sloužily k eliminaci

mechanického namáhání rostliny a k zajištění pevného, stabilního kontaktu elektrody s rostlinnou tkání.



*Obrázek 5.3 Vyrobený klips pro stabilizaci kontaktu mezi rostlinou tkání a Ag/AgCl elektrodou.*

Pro snímání jednoho kanálu jsme potřebovali alespoň dvě elektrody, z čehož jedna byla výše popsaného typu, umístěná na vybraném listu a druhá elektroda byla přes solný můstek vložena do misky s vodou (Obr. 5.4, Obr. 5.5). Solný můstek byl tvořen skleněnou fritou naplněnou 0,3 M roztokem KCl. Tato elektroda sloužila jako referentní.



*Obrázek 5.4 Referentní argentochloridová elektroda.*

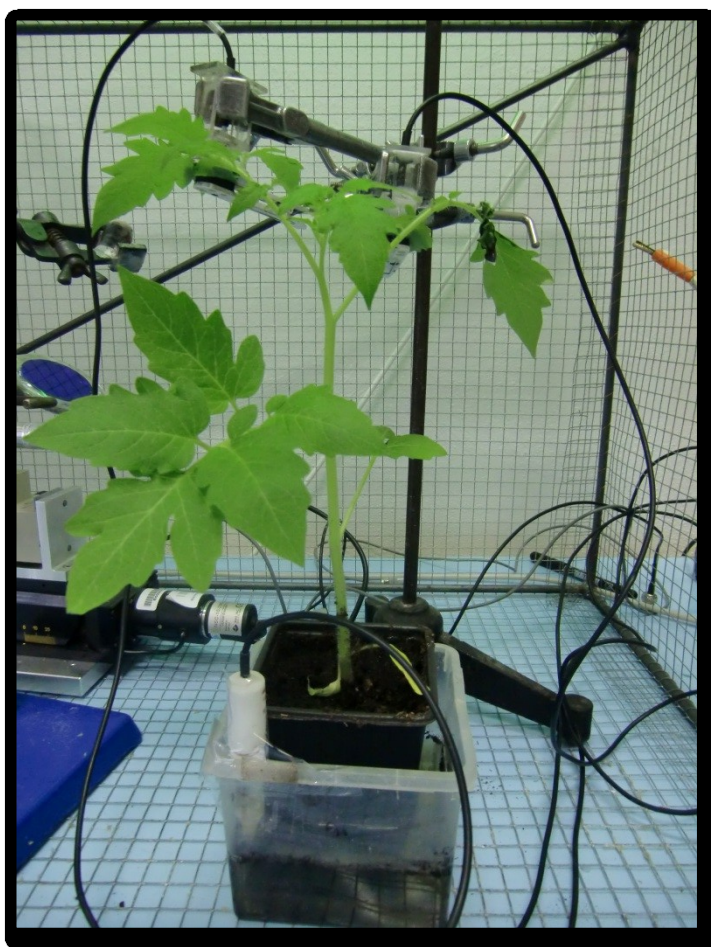


*Obrázek 5.5 Referentní argentschloridová elektroda ponořená do misky v vodou.*

Jelikož jsme v rámci našeho měření měřili vždy záznam dvou kanálů, museli jsme na danou rostlinu umístit celkem tři elektrody, z čehož dvě byly tzv. měřící a jedna elektroda byla referentní. Jednalo se tedy o tzv. unipolární měření. Abychom zachovali stabilní podmínky měření, elektrody jsme umísťovali vždy do stejných pozic. Rovněž jsme se snažili zachovat shodné vzdálenosti mezi těmito elektrodami. Měřící elektrody byly lokalizovány vždy na druhém a třetím složeném listu rajčete. Vodivé spojení mezi elektrodou a rostlinnou tkání zajišťoval běžný gel pro měření EKG (VUP, Prievidzda, Slovenská republika). Referentní elektroda byla ponořena do misky s vodou a z důvodu zajištění stabilní pozice byla k misce přilepena pomocí lepicí pásky. Toto schématické umístění elektrod je vyobrazeno na Obr. 5.6.

Kromě lokalizace elektrod jsme se v rámci přípravy měření věnovali i podmínkám okolního prostředí. V měřící místnosti byla udržována stabilní teplota 22 °C. Měření probíhalo v zatemněné místnosti, ve které svítila pouze zelená zářivka. Před samotným měřením byly rostliny nejméně po dobu třiceti minut aklimovány na tmě. Před měřením evokovaných potenciálů bylo nutné vyčkat aspoň 30 minut, optimálně 60 minut, aby došlo k ustálení výchozí hodnoty potenciálu.



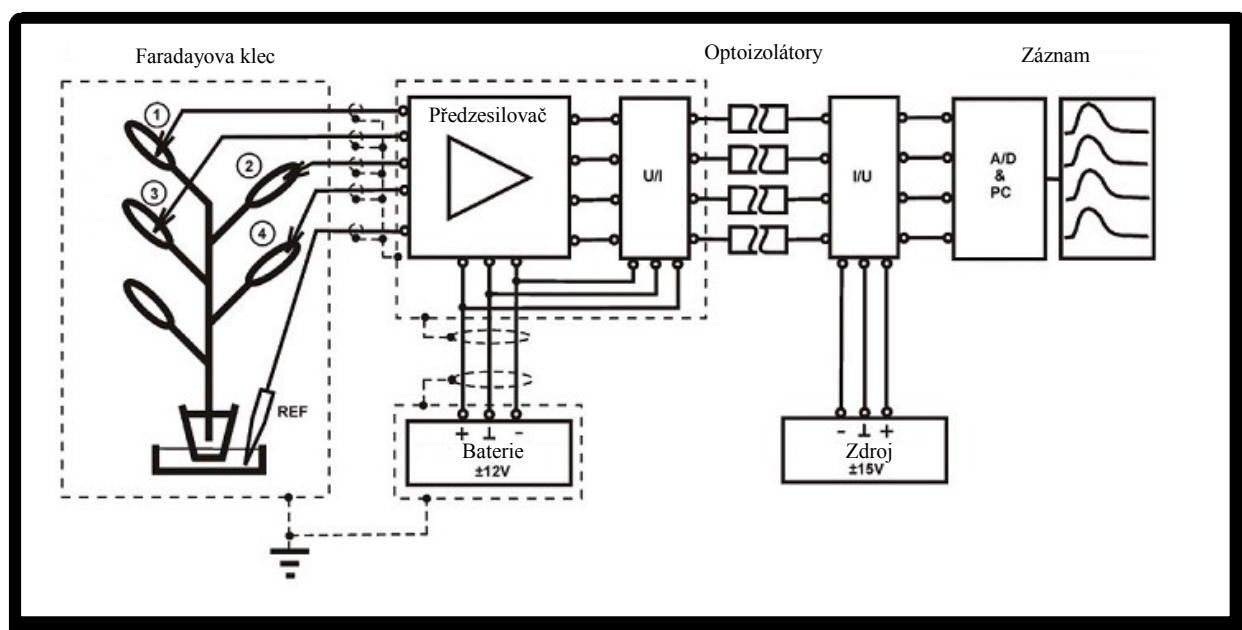


Obrázek 5.6 Schématické rozmístění elektrod na rajčeti tyčkovém (*Lycopersicon lycopersicum*) odrůdy Tornádo. Měřicí argento-chloridové elektrody jsou umístěny na druhém a třetím složeném listu rostliny. Referentní elektroda je ponořena do misky s vodou. Tato elektroda je fixována lepicí páskou k misce.

### 5.2.2 Měřicí aparatura

K samotnému měření jsme používali aparaturu sestavenou doktorem Pavlem Krchňákem z přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Navržené zařízení, umožňující měřit čtyři kanály, se skládá z několika základních částí, a těmi jsou zesilovač, napěťově proudový převodník, čtyři optoizolátory, proudově napěťový převodník a analogově digitální převodník, který je součástí počítače (Obr. 5.7). Klíčovou součástí zesilovače je diferenční zesilovač s vysokým vstupním odporem. Jedná se o typ INA 116 (Burn-Brown, Tucson, USA) s deklarovaným vstupním odporem  $10^{15} \Omega$ . Pokud vezmeme při výpočtu do úvahy i vodiče a vstupní konektory, tak se výsledná vstupní hodnota odporu zesilovače bude pohybovat v rozmezí mezi  $10^{13} - 10^{14} \Omega$ . Zesílení celého zesilovače bylo nastavitelné a pohybovalo se v rozmezí od 100 do 1000. (Ilík et al., 2010)





Obrázek 5.7 Elektrické schéma čtyřkanalového zařízení pro měření povrchových elektrických potenciálů rostlin. Přerušovaná čára znázorňuje uzemnění okruhu. (U/I – napětově proudový převodník, I/U – proudově napětový převodník, A/D – analogově digitální převodník, PC – počítač, Ref – referenční elektroda)

Takovéto zařízení je velmi citlivé. Jelikož se změny povrchových elektrických potenciálů rostlin pohybují v řádu desítek milivoltů, je potřeba toto zařízení důkladně odstínit. Pokud bychom prováděli měření bez jakéhokoli odstínění, nebyli bychom z největší pravděpodobnosti schopni rozeznat ani hrubé rysy užitečného signálu. Právě z těchto důvodů je pro napájení zesilovače použit nezávislý zdroj (dvě 12 V Pb baterie) a zesilovač s analogově digitálním převodníkem jsou vzájemně galvanicky odděleny pomocí optoizolátorů. Dalším opatřením je umístění měřené rostliny do Faradayovy klece. Tyto konstrukční úpravy vedly k významné redukci šumu. Protože byly před analogově digitální převodník zařazeny optoizolátory, musel se před ně zařadit ještě napětově proudový převodník, který je schopen napětový signál převést na proudové změny. Reverzní převodník se nacházel za optoizolátory. Komponentou pro analogově digitální převod byla komerčně dostupná 12-bitová data akvizitní karta PCA-7228AL (Tedia, Plzeň, Česká republika), jež byla integrována do počítače. Měřený záznam byl zobrazován pomocí programu ScopeWin (Tedia, Plzeň, Česká republika). Součástí měřicího řetězce byly samozřejmě i elektrody, které jsou popsány v předchozí kapitole. (Ilík et al., 2010)

## 5.3 Měření evokovaných variačních potenciálů

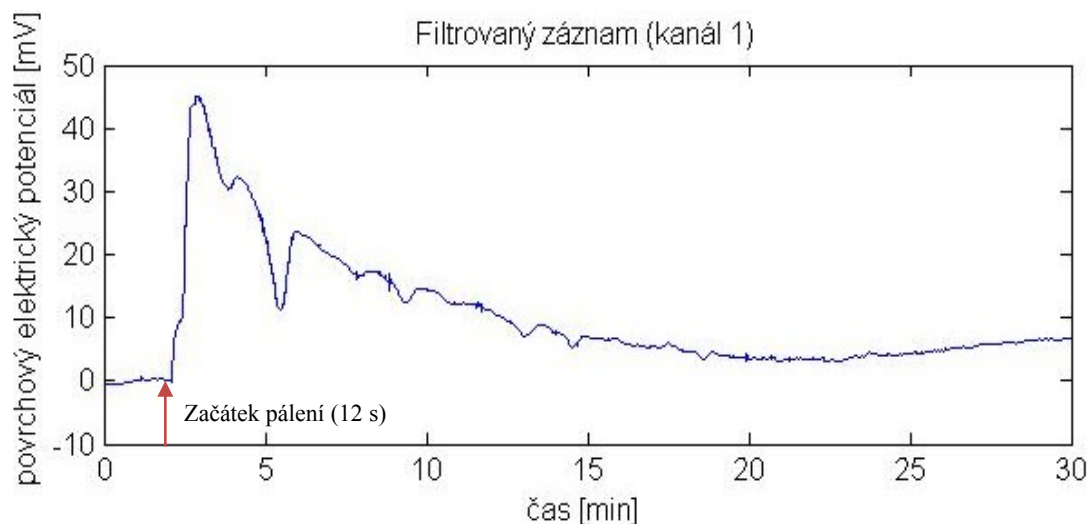
Experiment spočíval v proměření sady deseti rostlin rajčete tyčkového (*Lycopersicon lycopersicum*) odrůdy Tornádo. V této práci jsme chtěli změřit evokované potenciály, tedy potenciály, které vznikají jako reakce na nějaký podnět. Jak se můžete dočíst v teoretické části této práce (Kapitola 3.5), existuje mnoho typů podnětů, které mohou vyvolat různé elektrické změny rostlinné tkáně. Základní dělení těchto podnětů je na destruktivní a nedestruktivní. Pokud je podnět nedestruktivní je možné zaznamenat změny variačních i akčních potenciálů. Je - li však podnět destruktivní, dojde ke změnám pouze na úrovni potenciálů variačních. Pro náš experiment jsme zvolili podnět destruktivní – popálení. Z tohoto důvodu jsme také zaznamenávali změny pomalo vlnných potenciálů – variačních.

Postup měření byl tedy následující. Všechny rostliny byly před začátkem měření umístěny do zatemněné místnosti se zeleným světlem. Po třiceti minutové aklimaci na tmou mohlo začít dílčí měření. Nejprve jsme zapnuli počítač a měřicí aparaturu. V počítači jsme spustili program ScopeWin, který sloužil k zaznamenávání, ukládání a případné konverzi naměřených průběhů. V programu jsme nastavili délku záznamu a vzorkovací frekvenci. Délka záznamu byla 30 minut. Vzorkovací frekvence byla 72 Hz. Jelikož jsme měřili nízkofrekvenční signál, byla tato hodnota dostačující. Pro záznam dvou kanálů jsme na rostlinu umístili celkem tři elektrody. Umístění odpovídalo schématu popsánému v kapitole 5.2.1 Příprava měření. Vodivý kontakt mezi elektrodou a rostlinnou tkání jsme zajistili nanesením malého množství běžného EKG gelu mezi hrot elektrody a rostlinnou tkáň, a to pomocí stříkačky se zkrácenou jehlou. Po této přípravě jsme spustili záznam potenciálů. Jelikož ještě nedošlo ke stabilizaci kontaktu elektroda – tkáň, tak se aktuální hodnota potenciálu pohybovala na hodnotě různé od nuly, která se lišila pro každou měřenou rostlinu. Pro měření evokovaných potenciálů bylo zapotřebí dosáhnout stabilní výchozí hodnoty měřeného potenciálu. Z tohoto důvodu jsme nechali kontakt elektroda - tkáň ustálit po dobu cca 30 minut. Po této době byla již zaznamenávaná hodnota konstantní (u jednotlivých rostlin se hodnota lišila). Ustálená hodnota se nenacházela v nulové hodnotě, a proto jsme ji pomocí potenciometru přesunuli do nuly. Záznam z obou měřených kanálů byl posunut na nulovou výchozí hodnotu. Abychom mohli porovnávat záznamy z různých rostlin, museli jsme výchozí hodnotu potenciálu vždy přesunout k nule. S touto úpravou bylo možné naměřené průběhy variačních potenciálů porovnávat. Tímto posledním krokem jsme ukončili fázi přípravy měření a mohli jsme přejít k záznamu změn variačního potenciálu vyvolaného popálením. Rostlinu jsme pálili pomocí dřevěné špejle, jejíž konec byl zapálen. Po spuštění záznamu v programu ScopeWin jsme vyčkali přesně 120 sekund a poté jsme měřenou rostlinu popálili na druhém složeném listu rajčete. Doba pálení byla vždy 12 sekund. Jiným způsobem nebyl tepelný podnět kvantifikován. Po uplynutí 30 minut záznamu se program sám zastavil. Poté bylo potřeba naměřená data uložit ve

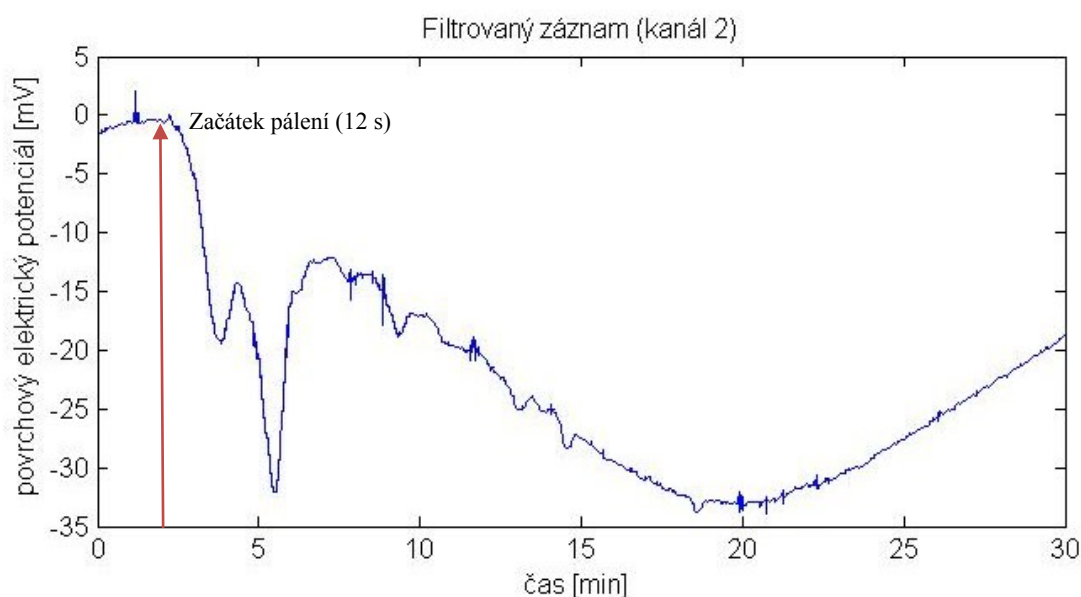
formátu programu ScopeWin (.w) a provést následnou konverzi dat do textového souboru. Data uložená v textovém formátu (.txt) byla dále zpracovávána v prostředí programu Matlab.

## 5.4 Výsledky měření a zpracování naměřených dat

Výše uvedeným způsobem jsme tedy proměřili sadu deseti rostlin rajčete tyčkového (*Lycopersicon lycopersicum*) odrůdy Tornádo. Vždy jsme zaznamenávali průběh změn potenciálu ve dvou kanálech. Kanál jedna se nacházel na druhém složeném listu rajčete a kanál dva se nacházel na třetím složeném listu rajčete. U většiny rostlin se nám podařilo zaznamenat stejné trendy v šíření variačního potenciálu rostlinou. Po 12 s popálení došlo v záznamu obou kanálů k pozorovatelným změnám. V záznamu kanálu 1 bylo možné rozeznat nárůst potenciálu v řádu desítek milivoltů. V záznamu kanálu 2 byl pozorován pokles potenciálu v řádu desítek milivoltů. U obou kanálů došlo v průběhu záznamu (30 minut) k postupnému návratu směrem k výchozím hodnotám. Ilustrační záznam průběhu změn evokovaných potenciálu v reakci na popálení plamenem ukazuje Obr. 5.8 a Obr. 5.9.

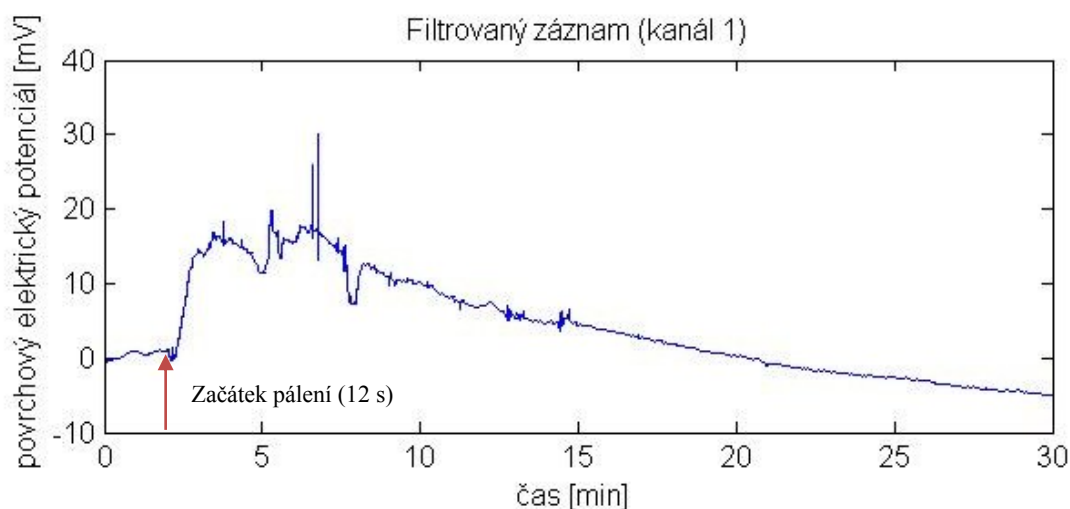


Obrázek 5.8 Průběh změn povrchového elektrického potenciálu měřený na rajčeti tyčkovém (*Lycopersicon lycopersicum*) odrůda Tornádo. V druhé minutě záznamu došlo k popálení na druhém složeném listu rostliny. Jedná se o filtrovaný záznam z kanálu 1.

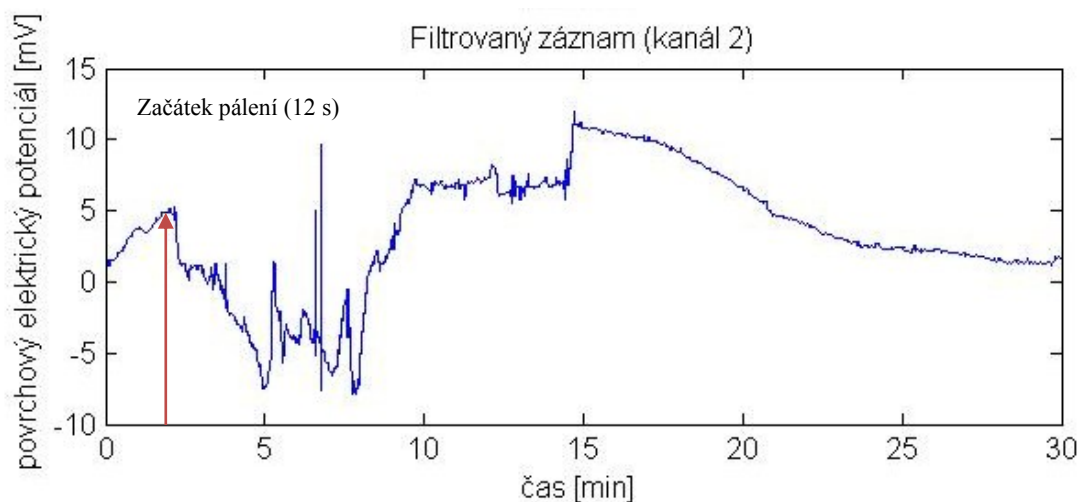


Obrázek 5.9 Průběh změn povrchového elektrického potenciálu měřený na rajčeti tyčkové (*Lycopersicon lycopersicum*) odrůda Tornádo. V druhé minutě záznamu došlo k popálení na druhém složeném listu rostliny. Jedná se o filtrovaný záznam z kanálu 2.

Na ukázkovém záznamu kanálu 1 (Obr. 5.8) je viditelný prudký nárůst z 0 mV na 40 mV a následný pozvolný pokles až pod hodnotu 10 mV. U kanálu 2 (Obr. 5.9) je pozorovatelný prudký pokles z 0 mV až na -30 mV. Po tomto překmitu následuje rychlý návrat směrem k výchozí hodnotě, poté dochází k postupnému poklesu potenciálu až k -35 mV a poté k pozvolnému vzestupu k -20 mV. Kvantitativně stejného záznamu se nám v rámci námi proměřené skupiny rostlin nepodařilo dosáhnout. Podařilo se nám dosáhnout stejných trendů v záznamech. Kvantitativně stejné záznamy se nepodařilo obdržet ani vědcům, kteří měli pro měření k dispozici geneticky stejnou skupinu (klony), stejného stáří a pěstovanou ve stejných přesně definovaných podmínkách. V našem případě jsme měřili geneticky heterogenní skupinu rostlin, které byly stejně staré a pěstované za stejných podmínek. Kvantitativní odlišnost může způsobit i stimul, kterým je evokovaný potenciál vyvoláván. V prezentovaných studiích je podnět kvantifikován pouze z hlediska doby působení, což může být pro tak náročné a složité interpretovatelné měření nedostačující. Kvantitativně odlišný záznam změn elektrických povrchových potenciálů je na obr. 5.10 a na obr. 5.11.

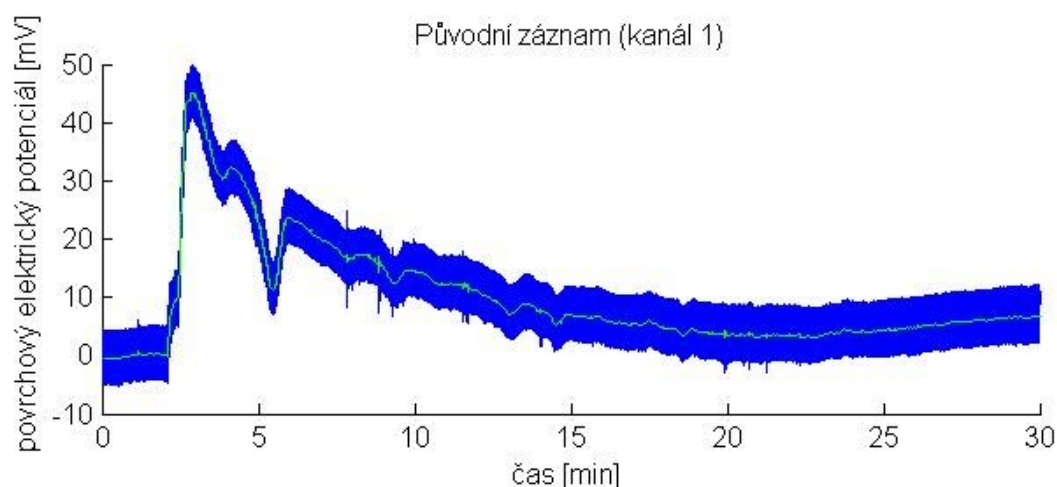


Obrázek 5.10 Průběh změn povrchového elektrického potenciálu měřený na rajčeti tyčkovém (*Lycopersicon lycopersicum*) odrůda Tornádo. V druhé minutě záznamu došlo k popálení na druhém složeném listu rostliny. Jedná se o filtrovaný záznam z kanálu 1.

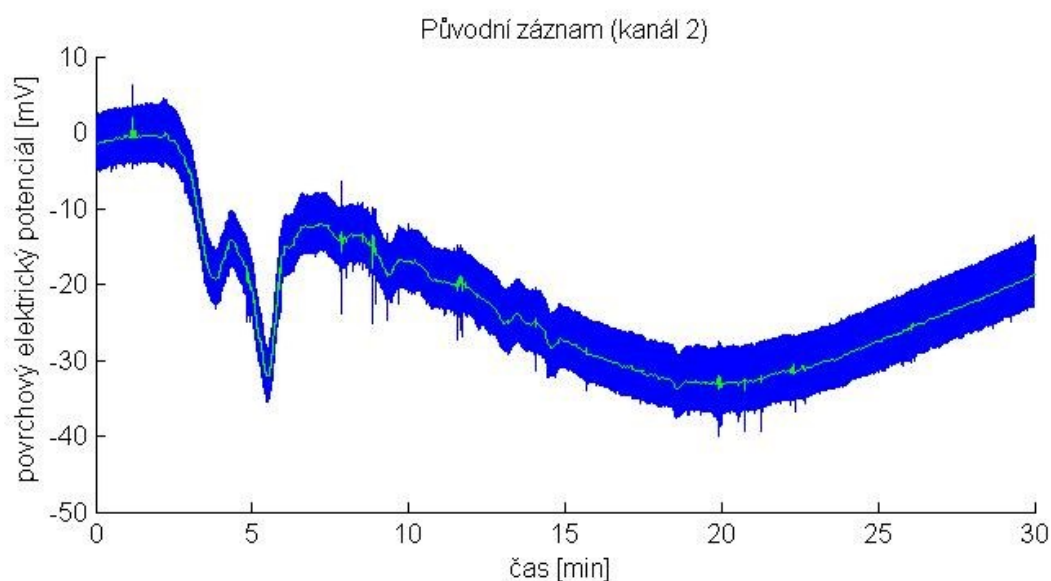


Obrázek 5.11 Průběh změn povrchového elektrického potenciálu měřený na rajčeti tyčkovém (*Lycopersicon lycopersicum*) odrůda Tornádo. V druhé minutě záznamu došlo k popálení na druhém složeném listu rostliny. Jedná se o filtrovaný záznam z kanálu 2.

Přestože jsme dbali na opatření vedoucí k co největší redukci šumu, nasnímaný signál byl výrazně zašuměný (Obr. 5.12, Obr. 5.13). Proto jsme v rámci zpracování naměřených dat v prostředí Matlab neprováděli pouze jejich zobrazení, ale také jsme z původního záznamu odstranili šum a získali jsme tak pouze užitečný signál.



Obrázek 5.12 Průběh změn povrchového elektrického potenciálu měřený na rajčeti tyčkovém (*Lycopersicon lycopersicum*) odrůda Tornádo. V druhé minutě záznamu došlo k popálení na druhém složeném listu rostliny. Jedná se o původní nefiltrovaný záznam z kanálu 1.



Obrázek 5.13 Průběh změn povrchového elektrického potenciálu měřený na rajčeti tyčkovém (*Lycopersicon lycopersicum*) odrůda Tornádo. V druhé minutě záznamu došlo k popálení na druhém složeném listu rostliny. Jedná se o původní nefiltrovaný záznam z kanálu 2.

Pro eliminaci šumu a zobrazení pouze užitečného signálu jsme použili diskrétní vlnkovou transformaci.

Výhodou použití vlnkové filtrace zašuměného signálu je rozklad signálu na postupná frekvenční pásma. Díky tomuto faktu je možné koeficienty diskrétní vlnkové transformace upravovat

pro každé pásmo zvlášť. Samotná úprava koeficientů diskretní vlnkové transformace se nejčastěji provádí prahováním. Po této úpravě se použije zpětná transformace. Prahování je nelineární operací a z tohoto důvodu je i vlnkový filtr nelineární. Pro reálné typy diskretních vlnkových transformací existují dva základní typy prahování, a to prahování měkké a tvrdé. Námi naměřené záznamy jsme upravili oběma možnými způsoby.

Tvrdé prahování:

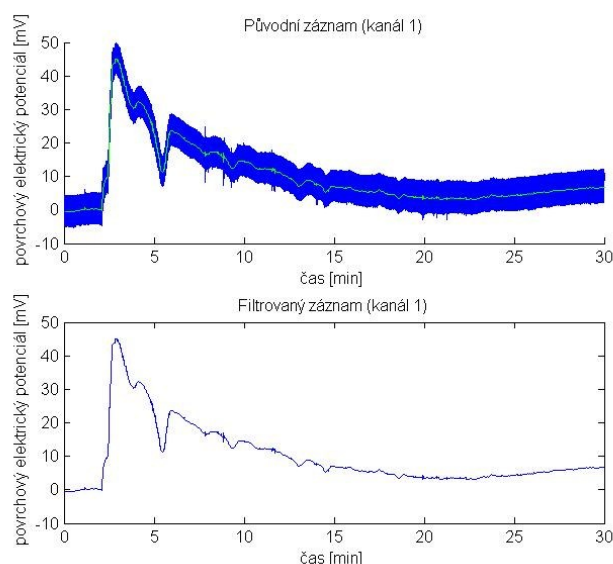
$$\lambda_x = \begin{cases} x, & \text{pro } |x| > \lambda \\ 0, & \text{pro } |x| \leq \lambda \end{cases} \quad (5.1)$$

Měkké prahování:

$$\lambda_x = \begin{cases} \text{sign}(x)(|x| - \lambda), & \text{pro } |x| > \lambda \\ 0, & \text{pro } |x| \leq \lambda \end{cases}, \quad (5.2)$$

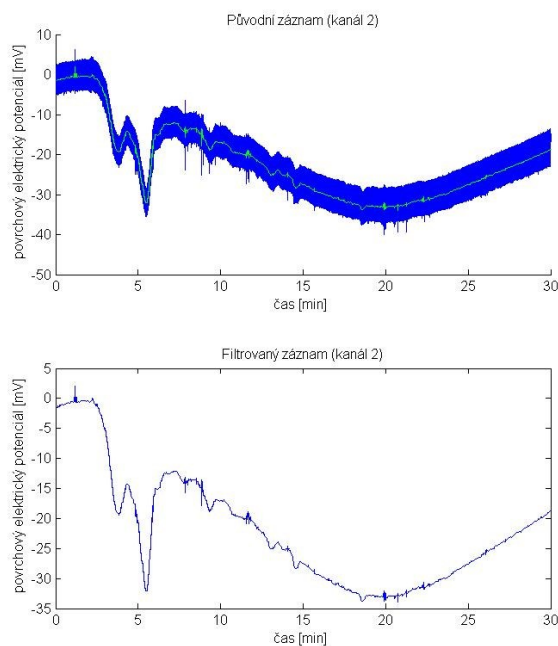
kde  $x$  je vstupní hodnota, práh je označený jako  $\lambda$  a  $\lambda_x$  je výstupní hodnotou.

Na následujících obrázcích lze porovnat původní záznam se záznamem filtrovaným diskretní vlnkovou transformací s úpravou koeficientů transformace měkkým prahováním (Obr. 5.14, Obr. 5.15).



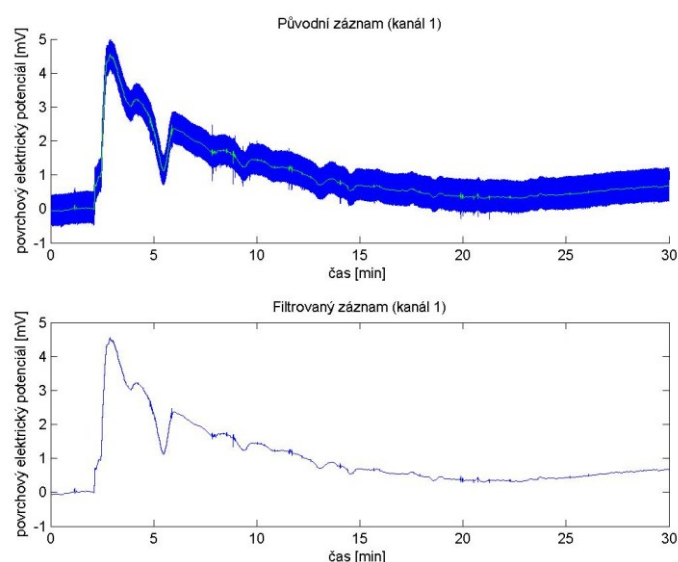
Obrázek 5.14 Průběh změn povrchového elektrického potenciálu měřený na rajčeti tyčkové (*Lycopersicon lycopersicum*) odrůda Tornádo. V druhé minutě záznamu došlo k popálení na druhém složeném listu rostliny. Jedná se o záznam z kanálu 1. Nahoře: původní záznam, Dole: záznam filtrovaný pomocí diskretní vlnkové transformace s měkkým prahováním.



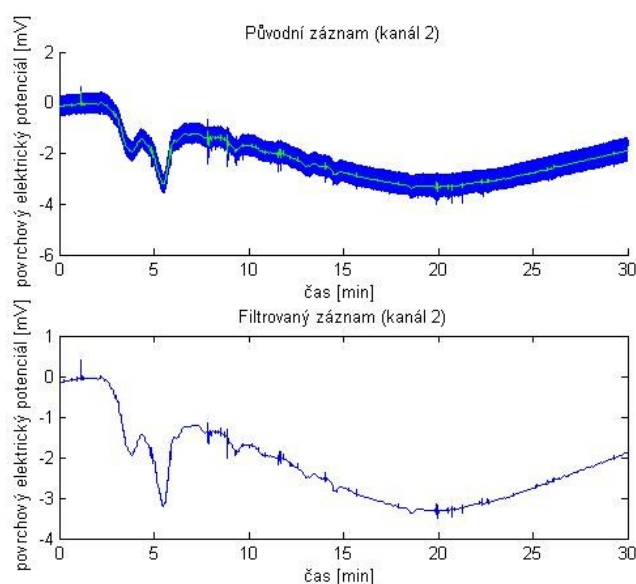


Obrázek 5.15 Průběh změn povrchového elektrického potenciálu měřený na rajčeti tyčkovém (*Lycopersicon lycopersicum*) odrůda Tornádo. V druhé minutě záznamu došlo k popálení na druhém složeném listu rostliny. Jedná se o záznam z kanálu 2. Nahoře: původní záznam, Dole: záznam filtrovaný pomocí diskrétní vlnkové transformace s měkkým prahováním.

Na následujících obrázcích lze porovnat původní záznam se záznamem filtrovaným diskrétní vlnkovou transformací s úpravou koeficientů transformace tvrdým prahováním (Obr. 5.16, Obr. 5.17).



Obrázek 5.16 Průběh změn povrchového elektrického potenciálu měřený na rajčeti tyčkovém (*Lycopersicon lycopersicum*) odrůda Tornádo. V druhé minutě záznamu došlo k popálení na druhém složeném listu rostliny. Jedná se o záznam z kanálu 1. Nahoře: původní záznam, Dole: záznam filtrovaný pomocí diskrétní vlnkové transformace s tvrdým prahováním.



Obrázek 5.17 Průběh změn povrchového elektrického potenciálu měřený na rajčeti tyčkovém (*Lycopersicon lycopersicum*) odrůda Tornádo. V druhé minutě záznamu došlo k popálení na druhém složeném listu rostliny. Jedná se o záznam z kanálu 2. Nahoře: původní záznam, Dole: záznam filtrovaný pomocí diskretní vlnkové transformace s tvrdým prahováním.

Filtrací diskretní vlnkovou transformací s měkkým i tvrdým prahováním se nám podařilo dosáhnout srovnatelných výsledků. Tímto zpracováním původního zašuměného signálu se nám podařilo získat čistý užitečný signál reprezentující změny povrchového elektrického potenciálu v čase.

## 5.5 Objektivizace měření evokovaných potenciálů

Objektivizačním parametrem, který jsme zvolili pro toto měření, bylo zastoupení pigmentů v rostlinné tkáni. Proč jsme vůbec chtěli měření potenciálů s něčím srovnávat? Odpověď je jednoduchá. Chtěli jsme zjistit, zda je tepelný stimul, který vyvolal elektrické změny tkáně, schopný vyvolat i změny na úrovni fyziologické.

### 5.5.1 Materiál

Ke stanovení obsahu pigmentů v rostlinné tkáni rajčete tyčkového (*Lycopersicon lycopersicum*) odrůdy Tornádo bylo nutné připravit 2 sady pigmentových extraktů. Jelikož jsme chtěli objasnit fyziologické změny způsobené tepelným podnětem, jeden extrakt pigmentů byl vždy připraven z listu odebraného před teplotní stimulací a druhý extrakt byl zhotoven z listu odebraného po tepelné stimulaci až po doběhnutí 30 minutového záznamu evokovaného potenciálu. Toto schéma odběru bylo dodrženo u všech deseti měřených rostlin. Připraveno bylo tedy 10 pigmentových

extraktů z listů odebraných před popálením a 10 extraktů z listů odebraných po popálení a po ukončení snímání potenciálů. Kontrolní i testovací list byl odstřižen z druhého složeného listu rajčete.

Extrakty pigmentů byly připraveny následujícím způsobem. Střední segment odebraného listu byl zvážen (hmotnost v mg byla zaznamenána) a vložen do třecí misky. Do třecí misky jsme k rostlinnému materiálu nasypali i špetku uhlíčitánu hořečnatého (Lach - Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika). Poté jsme do misky nalili malé množství 100% metanolu (Lach - Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika). Rychlým rozetřením této směsi jsme připravili homogenní extrakt, který jsme kvantitativně převedli do zkumavky. Objem extraktu jsme zaznamenali. Potřebnou část takto připraveného extraktu pigmentů jsme přefiltrovali přes teflonový filtr (velikost pórů - 2  $\mu\text{m}$ , Puradisc Syringe filters, Whatman, Anglie) do vialky.

Extrakty byly připravovány na půdě katedry biofyziky přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Jelikož analýza těchto extraktů byla prováděna na katedře chemie přírodovědecké fakulty Ostravské Univerzity v Ostravě, bylo nutné extrakty po přípravě v Olomouci uchovat v chladu (lednice 6 °C) a za nižší teploty je také převézt do Ostravy. Po převozu do laboratoří Ostravské Univerzity byly extrakty až do samotného zpracování uchovány při 6 °C v lednici.

### **5.5.2 HPLC analýza pigmentových extraktů**

Pigmentové extrakty byly analyzovány pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC). K analýze byl použit HPLC systém Agilent 1200, HPST s.r.o. s kolonou Zorbax SB-C18 (4,6x150mm,5 $\mu\text{m}$ ) (Obr. 5.18.).



*Obrázek 5.18 HPLC – Agilent 1200, monitor (vlevo), frakční kolektor (uprostřed nahoře), PDA detektor (uprostřed uprostřed), kolonový termostát (uprostřed dole), termostát pro autosampler a autosampler (vpravo dole), gradientová pumpa (vpravo nad autosamplérem), odplyňovač mobilní fáze a miska s lahvemi pro mobilní fáze (vpravo nahoře).*

Pro analýzu pigmentových extraktů bylo potřeba připravit dvě mobilní fáze (A, B). Mobilní fáze A se skládala z acetonitrilu (Lach - Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika), metanolu (Lach - Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika) a roztoku TRIS (hydroxymethyl)-aminomethanu (Lach - Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika). Roztok TRIS (hydroxymethyl)-aminomethanu byl připraven následujícím způsobem. Bylo naváženo 1,576 g TRIS (hydroxymethyl)-aminomethanu a rozpuštěno v 90 ml destilované vody. Tento roztok měl hodnotu pH 10,5. Pro přípravu mobilní fáze A bylo potřeba pH TRIS roztoku upravit na hodnotu 8. pH bylo upraveno pomocí kyseliny chlorovodíkové (HCl) na hodnotu 7,9 a následně pomocí 4 M roztoku hydroxidu sodného (NaOH) na hodnotu 8. Mobilní fáze A byla připravena smísením acetonitrilu, metanolu a roztoku TRIS (hydroxymethyl)-aminomethanu v poměru 87 : 10 : 3. Mobilní fáze B se skládala z metanolu a n-hexanu (Lach - Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika), jež byly smíseny v poměru 4: 1.

Před samotným použitím musely být obě mobilní fáze řádně odplyněny. Odplynění jsme provedli pomocí ultrazvukové lázně (5 minut) a vakuového degazéru, jenž je součástí HPLC sestavy. Odplyněn musel být před použitím i celý HPLC systém.

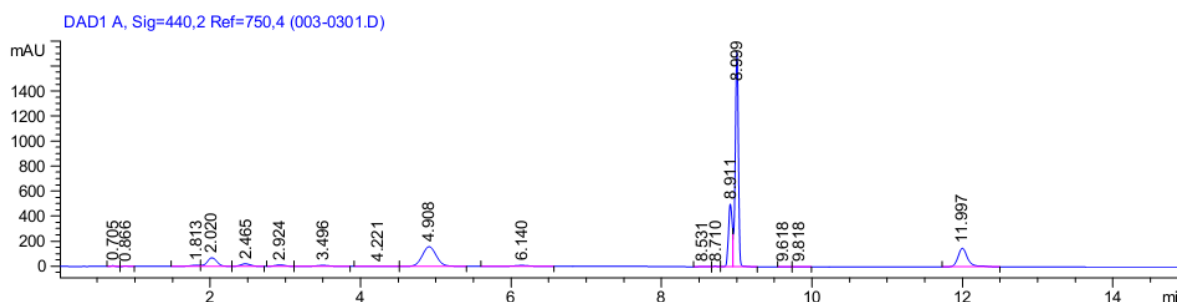
Připravené extrakty pigmentů v tmavých vialkách jsme naskládali do autosampleru. Poté jsme v programu Chemstation napsali sekvenci pro analýzu všech 20 extraktů a vybrali jsme metodu pro

danou analýzu. Tato metoda využívala dvou výše popsaných mobilních fází (A, B). Celkový čas analýzy jednoho extraktu pigmentů byl 15 minut. Průtok mobilní fáze kolonou byl 2 ml/min. Prvních 10 minut analýzy protékala systémem pouze mobilní fáze A, poté následoval dvouminutový gradient mobilní fáze B, do konce analýzy protékala systémem pouze mobilní fáze B. Mezi jednotlivými analýzami probíhal dvouminutový proplach systému, tzv. postrun.

Během celé analýzy probíhal záznam chromatogramu při třech zvolených vlnových délkách, a to při 270, 340 a 440 nm. Online byly sledovány i absorpční spektra jednotlivých eluentů v rozmezí od 400 do 500 nm.

### 5.5.3 Výsledky a zpracování chromatografické analýzy

HPLC analýzou pigmentových extraktů jsme získali množství chromatogramů, charakterizující zastoupení pigmentů v extraktu. Příklad získaného chromatogramu (Obr. 5.19). Pro množství jednotlivých pigmentů bylo nutné dílčí pigmenty kvantifikovat.



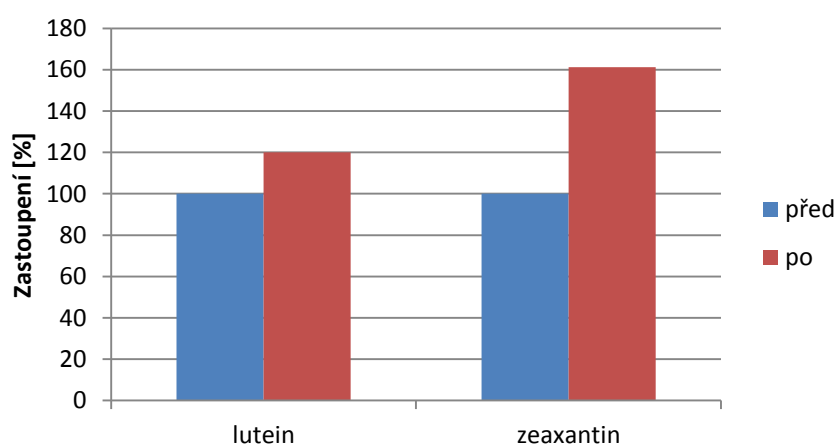
Obrázek 5.19 Chromatogram extraktu pigmentů z listu rajčete tyčkového (*Lycopersicon lycopersicum*) odrůdy Tornádo odebraného před popálením zaznamenaný při 440 nm.

Kvantifikaci vybraných pigmentů jsme provedli zintegrováním naměřených chromatogramů a následným přepočtem pomocí konverzních faktorů (Farber et al., 1997). Tímto přepočtem jsme získali množství pigmentu v  $\mu\text{g/ml}$ . Takto vypočtené hodnoty se však ještě nedaly vzájemně porovnávat, protože při jejich výpočtu nebyla zohledněna hmotnost listu, z kterého byl extrakt vyroben, a objem připraveného extraktu. Množství vybraných pigmentů v  $\mu\text{g/ml}$  jsme tedy ještě přepočítali vzhled k výše popsaným faktům. Touto úpravou jsme tedy získali kvantitativní hodnotu vyjádřenou v mg vybraného pigmentu na g čerstvého listí.

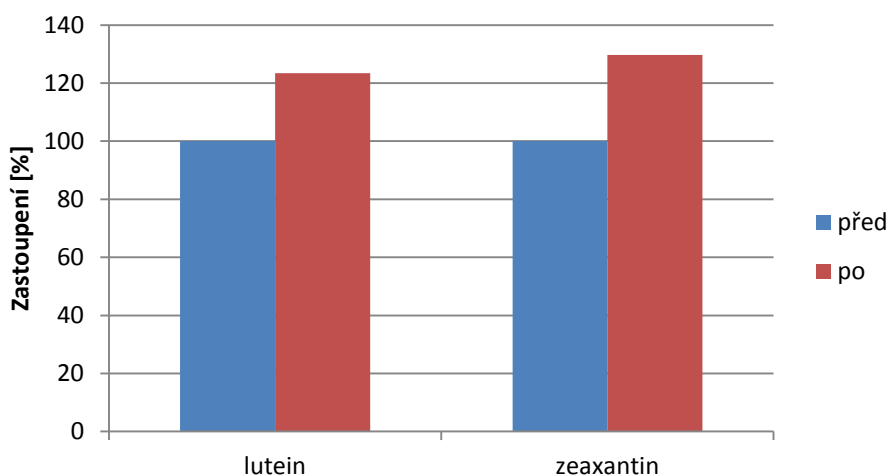
V naměřených chromatogramech jsme sledovali změny obsahu luteinu a zeaxantinu. Lutein a zeaxantin patří do skupiny karotenoidů, konkrétně xantofylů, což jsou jejich kyslíkaté deriváty. Jedná se o žluté pigmentační látky, které v rostlinném organismu zastávají mnoho funkcí. Především jsou to

však významné antioxidanty, které hrají důležitou roli v odpovědi na stresové reakce, kterým je rostlina vystavena. A právě z tohoto důvodu jsme se v rámci objektivizace měření evokovaných potenciálů v reakci na popálení zabývali změnami jejich obsahu.

Po vyhodnocení všech dat jsme u všech deseti rostlin zaznamenali stejný trend, a to nárůst obsahu luteinu i zeaxantinu po popálení rostliny. Na následujících obrázcích můžete vidět ukázky trendů, které jsme analýzou obsahu luteinu a zeaxantinu získali (Obr. 5.20, Obr. 5.21).



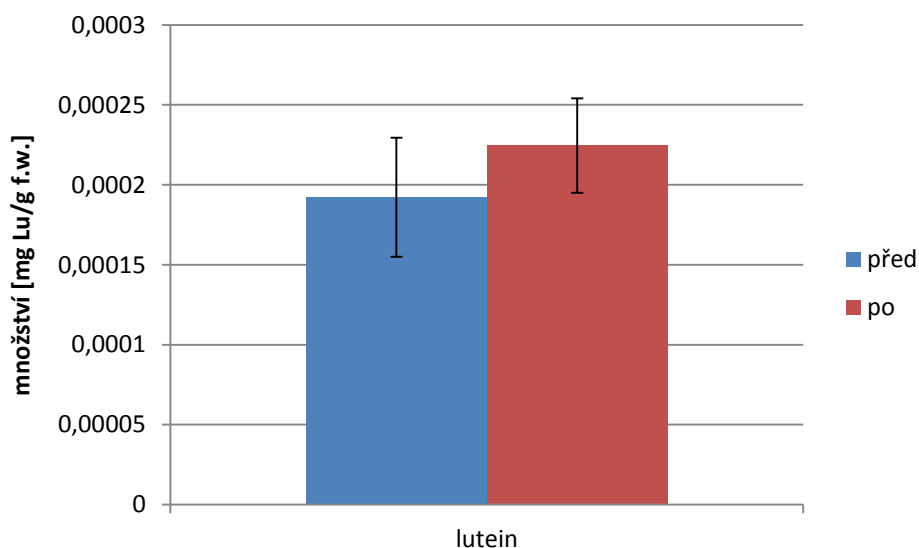
Obrázek 5.20 Procentuální zastoupení luteinu a zeaxantinu v extraktu pigmentů z listu rajčete tyčkového (rostliny 1) odebraného před a po popálení. Množství daného pigmentu v extraktu z listu odebraného před popálením považujeme za 100 %.



Obrázek 5.21 Procentuální zastoupení luteinu a zeaxantinu v extraktu pigmentů z listu rajčete tyčkového (rostliny 3) odebraného před a po popálení. Množství daného pigmentu v extraktu z listu odebraného před popálením považujeme za 100 %.

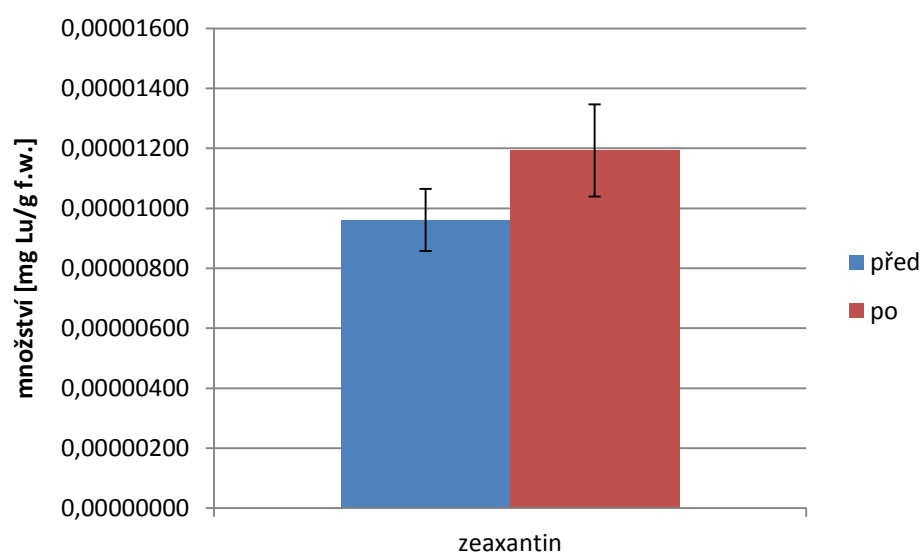
Za účelem prokázání těchto trendů jsme provedli statistické zpracování naměřených dat ve statickém programu R. Testovali jsme tedy průkaznost změn v obsahu luteinu a zeaxantinu v pigmentových extraktech vzhledem k vystavení rostliny popálení. Jak pro lutein tak pro zeaxantin jsme testovali soubor čítající 10 měření (10 rostlin). V prvním kroku bylo potřeba určit, zda jsou naměřená data parametrická. Z tohoto důvodu bylo nutné ověřit normalitu dat a shodu rozptylů. K otestování normality dat jsme použili Shapiro-Wilk normality test. Tímto testem jsme prokázali, že naše data (obsah luteinu i zeaxantinu) pocházejí z normálního rozdělení. Shodu rozptylů u obou souborů jsme prokázali použitím F testu. Dokázali jsme tedy, že naše data jsou parametrická a můžeme tedy k jejich otestování použít parametrické testy. Jelikož analyzujeme v rámci jednoho souboru pouze dvě skupiny, které mezi sebou mají časový vztah (obsah pigmentu před popálením, obsah pigmentu po popálení), můžeme k testování použít párový T test (Welchův test). Na hladině významnosti 0,05 jsme prokázali signifikantní rozdíl v obsahu luteinu i zeaxantinu před a po popálení dané rostliny. V obou případech došlo k signifikantnímu nárůstu v obsahu pigmentu po popálení rostliny.

Následující obrázky reprezentují průměrný obsah luteinu a zeaxantinu před a po popálení (Obr. 5.22, Obr. 5.23).



Obrázek 5.22 Průměrný obsah luteinu v rajčeti tyčkovém (*Lycopersicon lycopersicum*) odrůdy Tornádo před a po popálení. ( $N=10$ ,  $\pm SD$ )





Obrázek 5.23 Průměrný obsah zeaxantinu v rajčeti tyčkovém (*Lycopersicon lycopersicum*) odrůdy Tornádo před a po popálení. (N=10,  $\pm$ SD)

## 6 Závěr

V rámci této diplomové práce byla zpracována literární rešerše se zaměřením na vznik, šíření a měření rostlinných potenciálů.

V experimentální části této práce jsme dospěli k následujícím závěrům:

- Na deseti rostlinách rajčete tyčkového (*Lycopersicon lycopersicum*) odrůdy Tornádo jsme naměřili průběhy evokovaných potenciálů, jež vznikaly v odpovědi na popálení rostliny. Jednalo se o záznamy změn pomalo vlnných potenciálů, tedy potenciálů variačních.
- Naměřená data byla zpracována v prostředí programu Matlab. Jelikož byly pořízené průběhy silně zašuměné, museli jsme provést kromě zobrazení signálu i jeho filtraci. K získání užitečného signálu jsme použili diskrétní vlnkovou transformaci (rozklad 7. řádu, typ: Daubechies 1) s úpravou koeficientů pomocí měkkého i tvrdého prahování. Filtrací s měkkým i tvrdým prahováním jsme dosáhli srovnatelných výsledků.
- Přestože jsme neměli geneticky homogenní skupinu rostlin, podařilo se nám v záznamech potenciálů obdržet stejné trendy.
- Dalším z cílů práce byla objektivizace měření evokovaných potenciálů. Za účelem prokázání také fyziologických změn jsme za objektivizační parametr zvolili zastoupení pigmentů v rostlinné tkáni rajčete tyčkového (*Lycopersicon lycopersicum*) odrůdy Tornádo. Zastoupení pigmentů bylo analyzováno pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC).
- Pro objektivizaci jsme vybrali porovnání obsahu luteinu a zeaxantinu před a po popálení měřené rostliny. V rámci kvantitativní analýzy jsme provedli přepočet obsahu luteinu a zeaxantinu na mg daného pigmentu na g čerstvé hmotnosti. Poté bylo provedeno statistické zpracování naměřených hodnot.
- Na hladině významnosti 0,05 jsme prokázali signifikantní nárůst množství luteinu i zeaxantinu v reakci na popálení.

# Seznam obrázků

Obrázek 3.1 Luigi Galvani., Obrázek 3.2 Alessandro Volta .....	3
Obrázek 3.3 Galvaniho experiment demonstrující svalovou kontrakci bez použití odlišných látek (tkáň a kov). .....	4
Obrázek 3.4 Carlo Matteucci. ....	5
Obrázek 3.5 Emil Heinrich du Bois-Reymond.      Obrázek 3.6 Hermann von Helmholtz. ....	5
Obrázek 3.7 Mimosa pudica.      Obrázek 3.8 Dionaea muscipula. ....	6
Obrázek 3.9 Past mucholapky (Dionaea muscipula) s úlovkem. ....	7
Obrázek 3.10 Typy cévních svazků. ....	7
Obrázek 3.11 Sítkovice. ....	8
Obrázek 3.12 Nitella spp. ....	9
Obrázek 3.13 Oliheň obecná. ....	9
Obrázek 3.14 Plasmodesma. ....	10
Obrázek 3.15 Schéma biologické membrány. ....	11
Obrázek 3.16 Schématické zobrazení strukturní hierarchie bílkovin. ....	14
Obrázek 3.17 Zakotvení integrálního proteinu v membráně. ....	15
Obrázek 3.18 Zakotvení transmembránového proteinu v membráně. ....	15
Obrázek 3.19 Průběh akčního potenciálu. ....	18
Obrázek 3.20 Skládání složených listů u Mimosy pudicy. ....	20
Obrázek 3.21 A) Zpeřený list Mimosy pudicy před průchodem variačního potenciálu. B) Zpeřený list Mimosy pudicy po průchodu variačního potenciálu. ....	21
Obrázek 3.22 Schématické znázornění průchodu elektrických signálů rostlinným pletivem. ....	23
Obrázek 5.1 Rajče tyčkové (Lycopersicon lycopersicum) odrůdy Tornádo. ....	28
Obrázek 5.2 Argentochloridová elektroda pro extracelulární měření. ....	29
Obrázek 5.3 Vyrobený klips pro stabilizaci kontaktu mezi rostlinou tkání a Ag/AgCl elektrodou. ....	30
Obrázek 5.4 Referentní argentochloridová elektroda. ....	30
Obrázek 5.5 Referentní argentochloridová elektroda ponořená do misky v vodou. ....	31
Obrázek 5.6 Schématické rozmístění elektrod na rajčeti tyčkovém (Lycopersicon lycopersicum) odrůdy Tornádo. ....	32
Obrázek 5.7 Elektrické schéma čtyřkanálového zařízení pro měření povrchových elektrických potenciálů rostlin. ....	33
Obrázek 5.8 Průběh změn povrchového elektrického potenciálu měřený na rajčeti tyčkovém (Lycopersicon lycopersicum) odrůda Tornádo. ....	35

Obrázek 5.9 Průběh změn povrchového elektrického potenciálu měřený na rajčeti tyčkovém ( <i>Lycopersicon lycopersicum</i> ) odrůda Tornádo. ....	36
Obrázek 5.10 Průběh změn povrchového elektrického potenciálu měřený na rajčeti tyčkovém ( <i>Lycopersicon lycopersicum</i> ) odrůda Tornádo. ....	37
Obrázek 5.11 Průběh změn povrchového elektrického potenciálu měřený na rajčeti tyčkovém ( <i>Lycopersicon lycopersicum</i> ) odrůda Tornádo. ....	37
Obrázek 5.12 Průběh změn povrchového elektrického potenciálu měřený na rajčeti tyčkovém ( <i>Lycopersicon lycopersicum</i> ) odrůda Tornádo. ....	38
Obrázek 5.13 Průběh změn povrchového elektrického potenciálu měřený na rajčeti tyčkovém ( <i>Lycopersicon lycopersicum</i> ) odrůda Tornádo. ....	38
Obrázek 5.14 Průběh změn povrchového elektrického potenciálu měřený na rajčeti tyčkovém ( <i>Lycopersicon lycopersicum</i> ) odrůda Tornádo. ....	39
Obrázek 5.15 Průběh změn povrchového elektrického potenciálu měřený na rajčeti tyčkovém ( <i>Lycopersicon lycopersicum</i> ) odrůda Tornádo. ....	40
Obrázek 5.16 Průběh změn povrchového elektrického potenciálu měřený na rajčeti tyčkovém ( <i>Lycopersicon lycopersicum</i> ) odrůda Tornádo. ....	40
Obrázek 5.17 Průběh změn povrchového elektrického potenciálu měřený na rajčeti tyčkovém ( <i>Lycopersicon lycopersicum</i> ) odrůda Tornádo. ....	41
Obrázek 5.18 HPLC – Agilent 1200. ....	43
Obrázek 5.19 Chromatogram extraktu pigmentů z listu rajčete tyčkového ( <i>Lycopersicon lycopersicum</i> ) odrůdy Tornádo odebraného před popálením zaznamenaný při 440 nm. ....	44
Obrázek 5.20 Procentuální zastoupení luteinu a zeaxantinu v extraktu pigmentů z listu rajčete tyčkového (rostliny 1) odebraného před a po popálení. ....	45
Obrázek 5.21 Procentuální zastoupení luteinu a zeaxantinu v extraktu pigmentů z listu rajčete tyčkového (rostliny 3) odebraného před a po popálení. ....	45
Obrázek 5.22 Průměrný obsah luteinu v rajčeti tyčkovém ( <i>Lycopersicon lycopersicum</i> ) odrůdy Tornádo před a po popálení. ( $N=10$ , $\pm SD$ ) ....	46
Obrázek 5.23 Průměrný obsah zeaxantinu v rajčeti tyčkovém ( <i>Lycopersicon lycopersicum</i> ) odrůdy Tornádo před a po popálení. ( $N=10$ , $\pm SD$ ) ....	47

## Seznam tabulek

<i>Tabulka 3.1 Fyziologické jevy vyvolané genezí akčních či variačních potenciálů. (převzato a upraveno dle Fromm a Lautner, 2006)</i> .....	25
--	----

## Použitá literatura

- DAVIES E. & STANKOVIC B. (2006) Electrical signals, the cytoskeleton, and gene expression: a hypothesis on the coherence of the cellular responses to environmental insult. In *Communication in Plants – Neuronal Aspects of Plant Life* (eds F. Baluska, S. Mancuso & D. Volkmann), pp. 309–320. Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg, Germany.
- DZIUBINSKA H., TREBACZ K. & ZAWADZKI T. (1989) The effect of excitation on the rate of respiration in the liverwort *Conocephalum conicum*. *Physiologia Plantarum* 75, 417–423.
- FROMM J. & SPANSWICK R. (1993) Characteristics of action potentials in willow (*Salix viminalis* L.). *Journal of Experimental Botany* 44, 1119–1125.
- FROMM J. & BAUER T. (1994) Action potentials in maize sieve tubes change phloem translocation. *Journal of Experimental Botany* 45, 463–469.
- FROMM J. & FEI H. (1998) Electrical signaling and gas exchange in maize plants of drying soil. *Plant Science* 132, 203–213.
- FROMM J. & LAUTNER S. (2006) Characteristics and functions of phloem-transmitted electrical signals in higher plants. In *Communication in Plants – Neuronal Aspects of Plant Life* (eds F. Baluska, S. Mancuso & D. Volkmann), pp. 321–332. Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg, Germany.
- FROMM J. & LAUTNER S. (2007) Electrical signals and their physiological significance in plants. *Plant, Cell and Environment* 30, 249–257.
- FROMM J., HAJIREZAEI M. & WILKE I. (1995) The biochemical response of electrical signaling in the reproductive system of Hibiscus plants. *Plant Physiology* 109, 375–384.
- HEDRICH R. & BECKER D. (1994) Green circuits - the potential of plant specific ion channels. *Plant Molecular Biology* 26, 1637–1650.
- ILÍK P., HLAVACKOVA V., KRCHNAK P. & NAUS J. (2010) A low-noise multi – channel device for the monitoring of systemic electrical signal propagation in plants. *Biologia Plantarum* 54 (1), 185–190.

- KNIGHT M.R., CAMPBELL A.K., SMITH S.M. & TREWAVAS A.J. (1991) Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature* 352, 524–526.
- KOZIOLEK C., GRAMS T.E.E., SCHREIBER U., MATYSSEK R. & FROMM J. (2004) Transient knockout of photosynthesis mediated by electrical signals. *New Phytologist* 161, 715–722.
- LAUTNER S., GRAMS T.E.E., MATYSSEK R. & FROMM J. (2005) Characteristics of electrical signals in poplar and responses in photosynthesis. *Plant Physiology* 138, 2200–2209.
- MANCUSO S. (1999) Hydraulic and electrical transmission of wound-induced signals in *Vitis vinifera*. *Australian Journal of Plant Physiology* 26, 55–61.
- PLIETH C., SATTELMACHER B., HANSEN U.P. & THIEL G. (1999) The action potential in Chara:  $\text{Ca}^{2+}$  release from internal stores visualized by  $\text{Mn}^{2+}$  induced quenching of furadexran. *Plant Journal* 13, 167–175.
- STAHLBERG R. & COSGROVE D.J. (1992) Rapid alteration in growth rate and electric potentials upon stem excision in pea seedlings. *Planta* 187, 523–531.
- STAHLBERG R. & COSGROVE D.J. (1994) Comparison of electric and growth responses to excision in cucumber and pea seedlings. I. Short-distance effects are due to wounding. *Plant, Cell & Environment* 18, 33–41.
- STAHLBERG R., CLELAND R.E. & VAN VOLKENBURGH E. (2006) Slow wave potentials – a propagating electrical signal unique to higher plants. In *Communication in Plants – Neuronal Aspects of Plant Life* (eds F. Baluska, S. Mancuso & D. Volkmann), pp. 291–308. Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg, Germany.
- STAHLBERG R. (2006) Historical Overview on Plant Neurobiology. *Plant Signaling & Behavior* 1 (1), 6–8.
- STANKOVIC B., WITTERS D.L., ZAWADZKI T. & DAVIES E. (1998) Action potentials and variation potentials in sunflower: an analysis of their relationship and distinguishing characteristics. *Physiologia Plantarum* 103, 51–58.

Elektronické zdroje:

Dostupné z: < [http://en.wikipedia.org/wiki/Luigi\\_Galvani](http://en.wikipedia.org/wiki/Luigi_Galvani) > [citováno 10. prosince 2011]



Dostupné z: < [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Alessandro\\_Volta.jpeg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Alessandro_Volta.jpeg)> [citováno 10. prosince 2011]

Dostupné z: < <http://vlp.mpiwg-berlin.mpg.de/people/data?id=per64>> [citováno 11. ledna 2012]

Dostupné z: < [http://en.wikipedia.org/wiki/Hermann\\_von\\_Helmholtz](http://en.wikipedia.org/wiki/Hermann_von_Helmholtz)> [citováno 11. ledna 2012]

Dostupné z: < [http://en.wikipedia.org/wiki/Carlo\\_Matteucci](http://en.wikipedia.org/wiki/Carlo_Matteucci)> [citováno 11. ledna 2012]

Dostupné z: < [http://botanika.borec.cz/o\\_pletiva.php](http://botanika.borec.cz/o_pletiva.php)> [citováno 12. ledna 2012]

Dostupné z: < <http://www.paradisearth.com/Plant%20Articles/Mimosa.html>> [citováno 12. ledna 2011]

Dostupné z: < <http://www.cascadecarnivores.com/gallery/dionaea/bigmouth.htm>> [citováno 13. ledna 2012]

Dostupné z: < [http://durokon.com/store/index.php?main\\_page=page&id=172](http://durokon.com/store/index.php?main_page=page&id=172)> [citováno 18. ledna 2012]

Dostupné z: < <http://ucivo.webnode.cz/album/mekkysi/mekkysi-hlavonozci-olihen-obecna-jpg/>> [citováno 20. ledna 2012]